

**Aktivierung des stillen Fumicyclin-Clusters
in *Aspergillus fumigatus* durch mikrobielle Kommunikation
mit *Streptomyces rapamycinicus***

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
„doctor rerum naturalium“ (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Diplom-Biologin Claudia König

geboren am 25.08.1985 in Jena

Jena, November 2014

- 1. Gutachter:** Prof. Dr. Axel A. Brakhage, Hans-Knöll-Institut, Jena
- 2. Gutachter:** Dr. Dirk Hoffmeister, Friedrich-Schiller-Universität Jena
- 3. Gutachter:** Prof. Dr. Gerhard Braus, Georg-August Universität Göttingen

Datum der öffentlichen Verteidigung: 10.03.2015

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung.....	1
Summary	2
Einleitung.....	3
1 Der humanpathogene Saprophyt <i>Aspergillus fumigatus</i>.....	3
1.1 Die Zellwand von <i>A. fumigatus</i>	5
1.2 Signaltransduktion in <i>A. fumigatus</i>	6
1.2.1 MAP-Kinasen in <i>A. fumigatus</i>	7
1.2.2 Regulation der intrazellulären Eisenkonzentration in <i>A. fumigatus</i>	8
2 <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	9
3 Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster	11
3.1 Molekularbiologische Methoden zur Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster	11
3.1.1 Interferenz mit der Chromatin-Struktur.....	11
3.1.2 Überexpression von Regulatorproteinen/Promotor-Austausch.....	12
3.1.3 Heterologe Expression von Sekundärmetabolit-Genclustern.....	12
3.2 Mikrobielle Interaktion – Mimikry physiologischer Bedingungen	13
3.3 Regulation und Funktion von Sekundärmetabolit-Genen.....	14
4 Ziel der Arbeit.....	16
Material und Methoden	17
1 Stämme und Materialien.....	17
1.1 Bakterien- und Pilz-Stämme	17
1.2 Medien und Zusätze	18
1.3 Lösungen und Puffer	20
1.4 Plasmide	22
1.5 Oligonukleotide	22
2 Kultivierung von Mikroorganismen.....	25
2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	25
2.2 Kultivierung von <i>S. rapamycinicus</i>	25
2.2.1 Kultivierung in Flüssigmedium	25
2.2.2 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Sporensuspensionen.....	25
2.3 Kultivierung von <i>A. fumigatus</i>	25
2.3.1 Kultivierung in Flüssigmedium	25
2.3.2 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Sporensuspensionen.....	26
2.4 Kokultivierung von <i>S. rapamycinicus</i> mit <i>Aspergillus spp.</i>	26
2.5 Gliotoxin-Bildung.....	26

2.6	Bestimmung der Auskeimungsrate	27
3	Molekularbiologische Methoden	27
3.1	Isolierung von Nukleinsäuren	27
3.1.1	Isolierung von Plasmid-DNA	27
3.1.2	Isolierung genomischer DNA	27
3.1.3	Isolierung von RNA	27
3.1.4	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen	28
3.1.5	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	28
3.2	Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren	28
3.2.1	Restriktionsverdau	28
3.2.2	Ligation von DNA-Fragmenten	28
3.2.3	Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	28
3.3	Generierung von Deletionskonstrukten	28
3.4	Generierung des <i>fccR</i> -Überexpressionsstammes (<i>OEfccR</i>)	29
3.5	Transformation von Mikroorganismen	29
3.5.1	Transformation von <i>E. coli</i>	29
3.5.2	Transformation von <i>A. fumigatus</i>	29
3.6	Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen	30
3.7	Nachweis von Nukleinsäuren	30
3.7.1	„Southern blot“	30
3.7.2	„Northern blot“	31
3.8	Nachweis von Proteinen – „Western blot“	31
4	Biochemische Methoden	32
4.1	Extraktion und Isolation	32
4.2	HPLC-, MS- und NMR-Analyse	32
5	Durchlichtmikroskopie	33
6	Datenbanken	33
7	Mausinfektionsmodell	34
	Ergebnisse	35
1	Kokultivierung des Pilzes <i>Aspergillus fumigatus</i> mit dem Bakterium <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	35
1.1	Einfluss von <i>Streptomyces rapamycinicus</i> auf die Metabolit-Produktion von <i>Aspergillus fumigatus</i>	35
1.2	Rolle der <i>fcc</i> -Gene bei der Fumicyclin-Biosynthese	38
1.2.1	Identifizierung des Regulators der Fumicyclin-Biosynthese	38
1.2.2	Rolle der Clustergene <i>fccB</i> , <i>fccC</i> , <i>fccD</i> und <i>fccE</i> bei der Fumicyclin-Produktion	44

2	Wirkung von <i>S. rapamycinicus</i> auf das Sekundärmetabolit-Profil anderer <i>Aspergillus</i>-Arten	52
3	Regulation der <i>fcc</i>-Cluster-Aktivierung in <i>A. fumigatus</i>	55
3.1	Einfluss von Histon-Modifizierungen auf die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters	56
3.2	Deletion des Histonacetyltransferasegens <i>GcnE</i>	57
3.3	Phänotypische Charakterisierung des <i>ΔgcnE</i> -Stammes	59
3.4	Einfluss der Eisen-Konzentration und Eisen-regulierter Gene auf die Transkription der <i>fcc</i> -Gene	64
3.5	Regulatorische Effekte von MpkA auf die Transkription der <i>fcc</i> -Gene	68
3.6	Einfluss von α-Glucan auf die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters	73
4	Virulenz des <i>ΔfccA</i>-Stammes im Mausinfektionsmodell	74
5	Die Verbreitung des Fumicyclin-Clusters in anderen Mikroorganismen	76
	Diskussion	81
1	Das Bakterium <i>Streptomyces rapamycinicus</i> induziert die Bildung von Fumicyclinen im Pilz <i>Aspergillus fumigatus</i>	81
1.1	FccR ist der Transkriptionsfaktor des <i>fcc</i> -Clusters und der Regulator der Fumicyclin-Biosynthese	82
1.2	FccB, FccC, FccD und FccE modifizieren das Produkt der Polyketidsynthese FccA	83
1.2.1	FccB katalysiert die Abspaltung der Fumicycline von der PKS	83
1.2.2	FccC ist eine Flavin-abhängige Monooxygenase und hydroxyliert ein Zwischenprodukt der Fumicyclin-Biosynthese	85
1.2.3	FccD ist eine Dimethylallyltryptophansynthase und katalysiert die Prenylierung der Fumicycline	86
1.2.4	Im <i>ΔfccE</i> -Stamm findet die Anreicherung eines Zwischenproduktes statt	87
1.3	Biosyntheseweg der Fumicycline	88
2	Regulation der Aktivierung des Fumicyclin-Clusters	90
2.1	Charakterisierung der <i>ΔgcnE</i> -Deletion in <i>A. fumigatus</i>	92
2.2	Eisenmangel und die Regulatoren der intrazellulären Eisenkonzentration, SreA und HapX, sind an der Regulation der Fumicyclin-Bildung beteiligt	94
2.3	Die Phosphorylierung von MpkA ist essentiell für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters während der Interaktion von <i>A. fumigatus</i> mit <i>S. rapamycinicus</i>	95
2.4	α-Glucan als Bestandteil der Zellwand ist für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters notwendig	97
3	Fumicycline sind keine Virulenzdeterminanten	99
4	Identifizierung zum Fumicyclin-Cluster homologer Sekundärmetabolit-Gencluster in Pilzen	100
5	Zusammenfassung	102
	Literaturverzeichnis	105
	Abbildungsverzeichnis	125

Tabellenverzeichnis	127
Abkürzungsverzeichnis	128
Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge	130
Danksagung	131
Ehrenwörtliche Erklärung	132

Zusammenfassung

Aspergillus fumigatus ist ein humanpathogener Saprophyt, der allergische Reaktionen und schwerwiegende systemische Infektionen hervorrufen kann. Das Genom von *A. fumigatus* enthält mehr als 20 Sekundärmetabolit-Gencluster. Viele dieser Cluster werden unter Laborbedingungen nicht transkribiert, die Sekundärmetabolite der kodierten Enzyme sind unbekannt. Durch Interaktion von *A. fumigatus* mit *Streptomyces rapamycinicus* konnte ein solches stilles Gencluster aktiviert und die Bildung der neu identifizierten Fumicycline induziert werden. Das im Cluster lokalisierte Gen *fccA* kodiert für eine Nicht-reduzierende Polyketidsynthase (NR-PKS, FccA). Zudem ist im Cluster das Transkriptionsfaktorgen *fccR* lokalisiert. Wie „Northern blot“-Analysen zeigten, kodiert *fccR* für den Regulator der Transkription aller im Cluster lokalisierten Gene und reguliert dadurch die Fumicyclin-Produktion. Weiterhin ist anzunehmen, dass das Gen *fccB* für eine Metallo- β -Lactamase-Typ Thioesterase kodiert, welche die Abspaltung des Polyketids von der PKS katalysiert und dass das Gen *fccD* eine Dimethylallyltryptophansynthase (FccD), *fccC* eine FAD-abhängige Monooxygenase (FccC) und *fccE* eine Epimerase/Dehydrogenase (FccE) kodiert und dass diese Enzyme die Zwischenprodukte der Fumicyclin-Biosynthese durch Prenylierung, Hydroxylierung und Epimerisierung modifizieren.

Für die Aktivierung eines stillen Sekundärmetabolit-Genclusters in *A. nidulans* durch Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* ist die Histonacetyltransferase GcnE essentiell. Wie in dieser Arbeit gezeigt wurde, war die homologe HAT GcnE in *A. fumigatus* (*AfgcnE*) nicht notwendig für die Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters. Die verzögerte Auskeimung der Sporen und die Deformation der Konidiophoren des *AfgcnE*-Deletionsstammes implizierte jedoch eine Rolle von GcnE bei der Konidiogenese. In *A. fumigatus* ist die Mitogen-aktivierte Proteinkinase MpkA an der Signaltransduktion, die zur Aktivierung des Fumicyclin-Clusters führt, beteiligt. Während der Interaktion änderte sich die Phosphorylierung von MpkA. Die Phosphorylierung von Threonin186 war entscheidend für die Transkription der *fcc*-Gene. Zudem beeinflusste sowohl der Aufbau der Zellwand sowie der Eisengehalt die Transkription der *fcc*-Gene und die Fumicyclin-Produktion. Jedoch hatte die Deletion der Fumicyclin-Biosynthesegene keinen Einfluss auf die Virulenz von *A. fumigatus* im Mausinfektionsmodell. Das Fumicyclin-Gencluster ist nicht spezifisch. Homologe Sekundärmetabolit-Gencluster konnten sowohl in anderen Aspergilli als auch in einigen Dermatophyten identifiziert werden.

Summary

Aspergillus fumigatus is a human pathogenic saprophyte, which can cause allergic reactions and severe systemic infections. The genome encodes more than 20 secondary metabolite gene clusters, most of which are not produced under standard laboratory conditions. One of these silent secondary metabolite gene clusters is activated in *A. fumigatus* when co-cultivated with *Streptomyces rapamycinicus*, which leads to the formation of newly described fumicyclines. Interestingly, these compounds apparently play no role during infection. The cluster encodes a polyketide synthase gene *fccA*, which catalyzes the formation of the polyketide backbone. The thioesterase FccB encoded by *fccB* hydrolyzes the polyketide product. FccR is a transcription factor encoded by *fccR*, which regulates the transcription of all *fcc* genes. Finally, there are genes encoding a monooxygenase (*fccC*), a dimethylallyl tryptophan synthase (DMAT, *fccD*) and an epimerase (*fccE*). The enzymes catalyze modifications of fumicyclines like hydroxylation, prenylation and conformational changes.

S. rapamycinicus also activates a silent secondary metabolite gene cluster in *A. nidulans*. In *A. nidulans*, the histone acetyltransferase GcnE was found to be essential for the activation of the orsellinic acid gene cluster. However, in this thesis it was shown that the *A. fumigatus* homologue GcnE was not needed for fumicycline production. The analysis of the *A. fumigatus* *gcnE* deletion mutant produced here, indicated that GcnE is required for germination and conidiophore morphology. Thus, GcnE is necessary for conidiogenesis in *A. fumigatus*.

Important for the activation of the fumicycline cluster is the mitogen-activated protein kinase MpkA. Its phosphorylation is modulated during the interaction of *A. fumigatus* with *S. rapamycinicus*. As found by the analysis of mutants of MpkA, it was found that the phosphorylation of threonine at position 186 is crucial for *S. rapamycinicus*-induced activation of fumicycline biosynthesis. The activation of the fumicycline gene cluster was also influenced by the iron content of the cell and the presence of α -glucans in the cell wall.

The fumicycline gene cluster is not specific to *A. fumigatus*. Other genomes such as *Neosartorya fischeri*, *A. nidulans* and several dermatophytes contain genes homologous to *fcc* genes of *A. fumigatus*.

Einleitung

1 Der humanpathogene Saprophyt *Aspergillus fumigatus*

Aspergillus fumigatus ist ein saprophytisch lebender filamentöser Pilz und gehört zu den Ascomyceten. Im Erdboden spielt er eine wichtige Rolle im Kohlenstoff- und Stickstoff-Kreislauf (Pitt, 1994; Haines, 1995; Tekaia & Latgé, 2005). Seine Verbreitung ist ubiquitär (Mullins *et al.*, 1976; Mullins *et al.*, 1984). *A. fumigatus* bildet rauchgrüne asexuelle Sporen, Konidien, von 2-3 μm Durchmesser (Abbildung 1), die über die Luft verbreitet bis in die Lungenbläschen des Menschen gelangen können (Samson & Van Reenen-Hoekstra, 1988; Latgé, 1999). *A. fumigatus* kann allergische Reaktionen hervorrufen. Bei Menschen mit supprimiertem Immunsystem, z. B. nach einer Organtransplantation, kann der Pilz in die Blutbahn gelangen und eine systemische Infektion auslösen (Bodey & Vartivarian, 1989; Andriole, 1993; Maschmeyer *et al.*, 2007). Diese führt in über 50 % der Fälle zum Tod (Ellis, 1999; Maschmeyer *et al.*, 2007). Bei immunkompetenten Menschen werden die eingeatmeten Sporen relativ zuverlässig durch das angeborene Immunsystem entfernt (Balloy & Chignard, 2009).

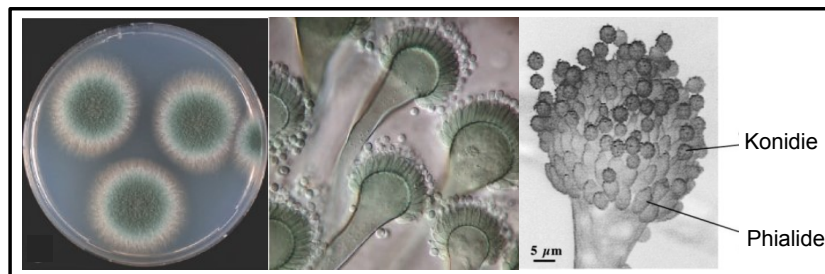


Abbildung 1: *A. fumigatus* auf Festmedium, sowie mikroskopische Aufnahmen der Konidiophore
 Links und Mitte: Brakhage and Langfelder (2002); Rechts: Samson *et al.* (2007)

Die grüne Färbung der Konidien wird durch das Sporenpigment Dihydroxynaphthol (DHN)-Melanin hervorgerufen. Die Biosynthesegene für diesen Sekundärmetaboliten sind in einem Cluster lokalisiert (Langfelder *et al.*, 1998; Tsai *et al.*, 1999). Das Melanin Pyomelanin wird von *A. fumigatus* gebildet, wenn L-Tyrosin dem Medium zugesetzt wurde (Schmaler-Ripcke *et al.*, 2009).

A. fumigatus ist thermophil und kann bei Temperaturen bis 55 °C wachsen und bis 70 °C überleben (Beffa *et al.*, 1998). Für das Wachstum von *A. fumigatus* ist Minimalmedium mit

einer Kohlenstoff- (z. B. Glukose) und einer Stickstoffquelle (z. B. Nitrat) sowie Spurenelementen ausreichend (Brakhage & Langfelder, 2002).

Für die Generierung von genetisch veränderten Stämmen stehen verschiedene Selektionsmarker zur Verfügung. Etabliert hat sich dabei die Verwendung von Resistenzgenen gegen Antibiotika wie *hph* (Hygromycin) (Latgé, 2001) und *ptrA* (Pyriithiamin) (Kubodera *et al.*, 2000; Kubodera *et al.*, 2002), sowie Uridin/Uracil als Beispiel für eine Auxotrophie in *A. fumigatus*, die durch entsprechende Biosynthesegene komplementiert werden kann (d'Enfert, 1996). *A. fumigatus* Sporen enthalten nur einen Nucleus und sind haploid, dies erleichtert die Isolierung von Klonen und die Charakterisierung von Mutanten (Brakhage & Langfelder, 2002). Für die Erzeugung von Deletionsmutanten wird die Methode der homologen Rekombination verwendet. Das heißt, das Resistenzgen wird flankiert von Bereichen homolog zu den 3'- und 5'-Sequenzen des zu deletierenden Gens. Es kann dennoch vorkommen, dass ein Deletionskonstrukt ektopisch in das Genom integriert wird. Der *A. fumigatus* Stamm CEA17 Δ *akuB*^{KU80} wurde genetisch modifiziert, so dass nur noch homologe Rekombination möglich ist (da Silva Ferreira *et al.*, 2006).

Die *A. fumigatus*-Stämme Af293 und A1163, beides klinische Isolate, wurden sequenziert (Nierman *et al.*, 2005; Fedorova *et al.*, 2008). Die Genome sind ca. 29 Mb groß, kodieren für ca. 9900 Gene, verteilt auf acht Chromosomen und haben einen G+C-Anteil von 49,9 %. Im Genom konnten auch Gene für die sexuelle Fortpflanzung und Entwicklung identifiziert werden (Nierman *et al.*, 2005). 2009 wurde die sexuelle Fortpflanzung von *A. fumigatus* beschrieben. Die teleomorphe Form trägt den Namen *Neosartorya fumigata* (O'Gorman *et al.*, 2009).

A. fumigatus produziert zahlreiche Sekundärmetabolite wie Fumagillin, Gliotoxin, Fumitremorgin, Verruculogen, Fumigaclavin, Helvolsäure, Fumitoxin, Pseurotin A, Pyripyropen, Fumiquinazolin und Sphingofungin (Latgé, 1999; Samson *et al.*, 2007; Frisvad *et al.*, 2009). Die Anzahl der identifizierten Sekundärmetabolit-Gencluster schwankt in Studien zwischen 22 und 37 (Nierman *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2007; Dhingra *et al.*, 2013; Inglis *et al.*, 2013). Einige dieser Cluster sind in den telomeren Bereichen der Chromosomen lokalisiert (Nierman *et al.*, 2005; Perrin *et al.*, 2007). Taxonomisch betrachtet ist *A. fumigatus* nahe verwandt mit *Neosartorya fischeri* (Fedorova *et al.*, 2008). Im Genus *Aspergillus* sind ca. 250 Arten beschrieben (Geiser *et al.*, 2007).

1.1 Die Zellwand von *A. fumigatus*

Die Zellwand bietet *A. fumigatus* Schutz vor Umwelteinflüssen. Sie ermöglicht dem Pilz die Penetration von festem Substrat und gewährleistet so die Versorgung mit Nährstoffen (Nierman *et al.*, 2005). Der Aufbau der Zellwand ist dynamischen Prozessen unterworfen. Die Zusammensetzung ist dabei abhängig vom Entwicklungsstadium des Pilzes und den umgebenden Umwelteinflüssen (Latgé, 2007; Abad *et al.*, 2010).

Die Zellwand besteht aus den Monomeren Glukose, Glukosamin, N-Acetylglukosamin, Galaktose und Mannose (Hearn & Sietsma, 1994). Aus diesen Bausteinen werden die Polysaccharide gebildet, die bis zu 90 % der Zellwand ausmachen. Der restliche Anteil der Zellwand besteht aus Proteinen (Gastebois *et al.*, 2009).

Die am meisten vorkommenden Polysaccharide sind α - und β -Glucane, Chitin und Galaktomannan (Hearn & Sietsma, 1994) (Abbildung 2). β -Glucane machen ca. ein Drittel der Zellwandpolysaccharide aus. Sie werden von einem Plasmamembran-ständigen β -Glucan-Synthase-Komplex gebildet. Dieser besteht aus der katalytischen Untereinheit Fks1 und den regulatorischen Untereinheiten Rho1-4 (Firon *et al.*, 2002; Mouyna *et al.*, 2004). Rho1 und Rho3 sind beteiligt an der Regulation der Zellwandintegrität und in der Hyphenspitze lokalisiert (Dichtl *et al.*, 2010). Die β -Glucanketten sind untereinander $\beta(1-3)$, $\beta(1-4)$ bzw. $\beta(1-6)$ verbunden. Durch diese Verknüpfung bilden die β -Glucane ein verzweigtes Netz und geben der Zellwand zusammen mit den anderen Polysacchariden eine dreidimensionale Struktur (Latgé, 2007; Abad *et al.*, 2010). Die β -Glucan-Synthase wird durch das Echinocandin Caspofungin inhibiert (Perlin, 2014). Die α -Glucane stellen bis zu 46 % der Zellwand-Polysaccharide. In *A. fumigatus* werden die α -Glucan-Synthasen Ags1, Ags2 und Ags3 für die Biosynthese der α -Glucane benötigt. Etwa 20 - 25 % der Zellwand-Polysaccharide sind Galaktomannane. Deren Synthese erfolgt durch Mannosyl- und Galaktosyl-Transferasen (Abad *et al.*, 2010). Ein weiteres Polysaccharid in der Zellwand ist Chitin (Mellado *et al.*, 1996). Im *A. fumigatus*-Genom sind 7 Chitin-Synthasegene (*chsA-G*) annotiert (Mellado *et al.*, 2003). Chitin ist kovalent an β -1,3-Glucan gebunden (Hearn & Sietsma, 1994).

Ein Teil der Zellwand-lokalisierten Proteine besitzen einen Glykosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker. Glucanosyltransferasen sind über dieses GPI-Motiv sowohl an die Zellwand als auch an die Membran gebunden. Viele Zellwand-Proteine sind mannoyliert. Diese Modifikation wird von Mannosyltransferasen katalysiert (Mouyna *et al.*, 2000; Abad *et al.*, 2010).

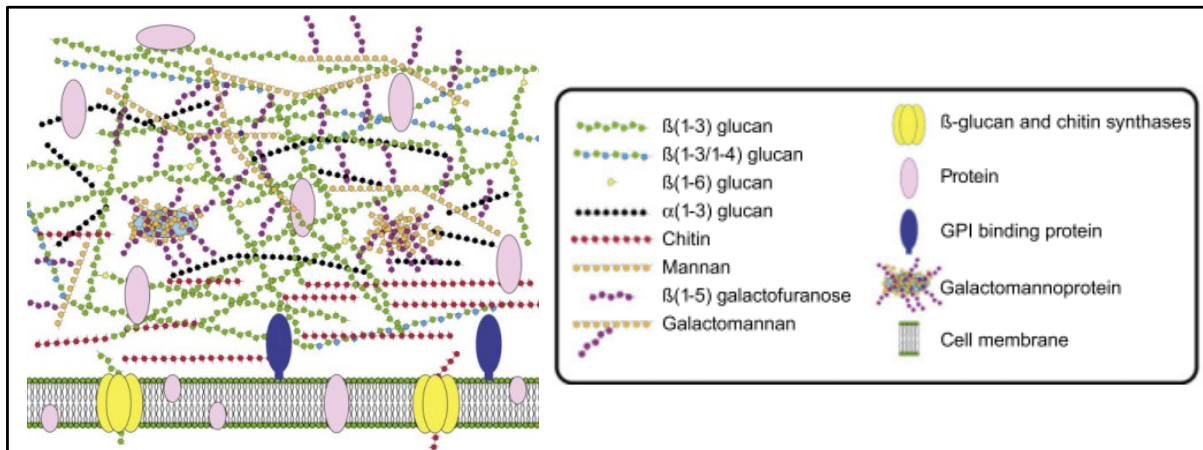


Abbildung 2: Aufbau der Zellwand von *A. fumigatus*

(Abad *et al.*, 2010)

1.2 Signaltransduktion in *A. fumigatus*

Die Wahrnehmung der Umwelt und die Weiterleitung der wahrgenommenen Signale ins Zellinnere geschieht über membranständige Rezeptoren (Abbildung 3) sowie zahlreiche noch uncharakterisierte Rezeptor-ähnliche Proteine (Grice *et al.*, 2013).

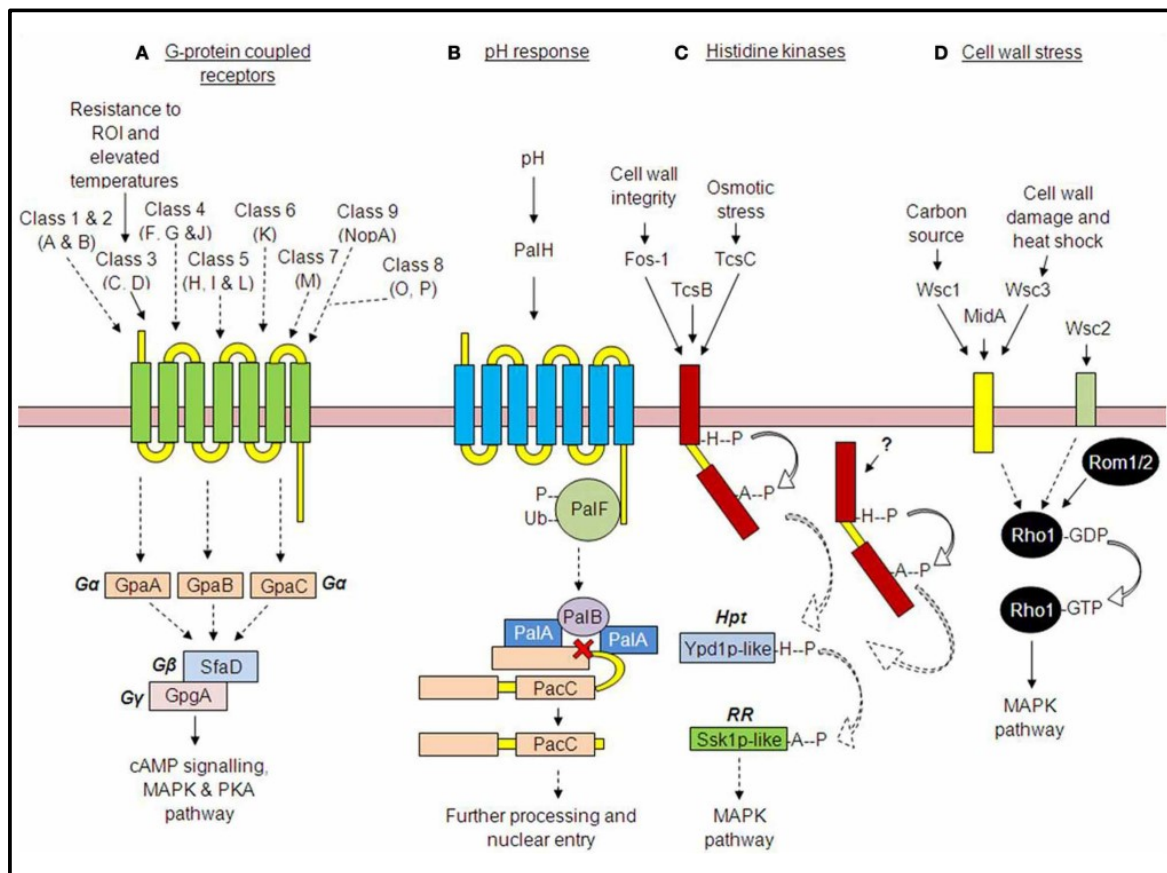


Abbildung 3: Rezeptorvermittelte Signalweiterleitung in *A. fumigatus*

(Grice *et al.*, 2013)

Histidin-Kinasen sind im Pilzreich weitverbreitete Sensoren für extrazelluläre Signale. Im Menschen kommen diese Proteine nicht vor (West & Stock, 2001). Das Genom von *A. fumigatus* kodiert für 13 putative Histidin-Kinasen (Ronning *et al.*, 2005; Tekaia & Latgé, 2005). Des Weiteren sind 15 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bekannt. Diese sind wahrscheinlich unter anderem verantwortlich für die Wahrnehmung von Pheromonen und dienen als Kohlenstoff- und Stickstoff-Sensoren (Gehrke *et al.*, 2010; Grice *et al.*, 2013). Der pH-Wert des umgebenden Mediums wird über PalH bestimmt. PalH ist ein 7-Transmembran-Rezeptor. Der C-Terminus befindet sich im Zytosol (Negrete-Urtasun *et al.*, 1999). Die Signaltransduktion verläuft über die Phosphorylierung und anschließende Ubiquitinierung von PalF und resultiert in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors PalC und der durch ihn regulierten Gene (Grice *et al.*, 2013).

1.2.1 MAP-Kinasen in *A. fumigatus*

Das zentrale Element vieler Signalweiterleitungskaskaden sind Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs). Bisher konnten in allen sequenzierten eukaryotischen Genomen MAPKs nachgewiesen werden. Durch diese Proteine wird die Reaktion auf extrazelluläre Signale reguliert (Ronning *et al.*, 2005). Eine entscheidende Rolle spielen MAPKs bei der Aufrechterhaltung der Zellwandintegrität. Die Rezeptoren Wsc1-3 bzw. MidA leiten extrazelluläre Signale an MAPKs weiter (Dichtl *et al.*, 2012; Grice *et al.*, 2013). MAPKs regulierte Signalwege enthalten ein konserviertes, dreiteiliges Modul, bestehend aus einer MAPK, einer MAPK-Kinase (MAPKK) und einer MAPKK-Kinase (MAPKKK). Bei Aktivierung der Kaskade phosphoryliert die MAPKKK die MAPKK und diese wiederum phosphoryliert die MAPK, die Transkriptionsfaktoren und andere Zielproteine reguliert (Valiante *et al.*, 2008). Das Genom von *A. fumigatus* kodiert für vier MAPKs: Saka, MpkA, MpkB, MpkC (May *et al.*, 2005). Saka und MpkC zeigen 82 % bzw. 65 % Ähnlichkeit zu Hog1, des Hoch-Osmolaritäts-Glyzerin (HOG)-Signalweges von *Saccharomyces cerevisiae*. MpkB ähnelt Fus3 und Kss1 aus *S. cerevisiae* jeweils zu ca. 60 %. In der Hefe übernehmen diese Proteine eine Rolle bei der Paarung sowie beim vegetativen Wachstum (Bardwell, 2004; Wang & Dohlman, 2004). In *A. nidulans* konnte ein Einfluss von MpkB auf die Bildung von Sekundärmetaboliten nachgewiesen werden (Atoui *et al.*, 2008). Im *mpkB*-Deletionsstamm werden weniger Mykotoxine gebildet, zudem ist die Transkription der Sterigmatocystin-Biosynthesegene geringer. Intaktes MpkB ist notwendig für eine normale Expression von *laeA*, einem globalen

Regulator von Sekundärmetabolit-Genen (Bok & Keller, 2004; Atoui *et al.*, 2008). MpkA wiederum ist zu 68 % identisch mit Slr2/Mpk1 von *S. cerevisiae* und ca. 90 % zu MpkA aus *A. nidulans*. MpkA ist entscheidend für die Zellwandintegrität von *A. fumigatus*. Mutanten, denen MpkA fehlt, zeigen eine drastische Verringerung des radialen Wachstums sowie eine verminderte Sporulation. Die Deletion von *mpkA* hat keinen Einfluss auf die Virulenz im Cyclophosphamid- und Cortison-Acetat-Maus-Modell. Die Sensitivität gegen Zellwandangreifende Substanzen wie Kongorot und Calcofluor White war im Vergleich zum Wildtyp stark erhöht (Valiante *et al.*, 2008; Valiante *et al.*, 2009). MpkA bildet zusammen mit Mkk2 (MAPKK) und Bck1 (MAKKK) ein funktionelles Modul (Valiante *et al.*, 2009).

MpkA wird von Mkk2 durch duale Phosphorylierung an konservierten Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert (Chang & Karin, 2001). Das Bck1/Mkk2/MpkA-Modul ist an der Regulation der Sekundärmetabolite Pyomelanin und Gliotoxin beteiligt. In Deletionsstämmen dieser Kinasen ($\Delta bck1$, $\Delta mkk2$ oder $\Delta mpkA$) war die Produktion von Pyomelanin deutlich erhöht (Valiante *et al.*, 2009). Die Transkription der Gliotoxin-Biosynthesegene ist in der $\Delta mpkA$ -Mutante verringert (Jain *et al.*, 2011). Außerdem inhibiert MpkA die Siderophor-Biosynthese durch Repression der Ornithin-Biosynthese. Dies erfolgt unabhängig von HapX und SreA, zwei wichtigen Regulatoren des Eisenhaushalts der Pilzzelle. Die Phosphorylierung von MpkA wird unter Eisenmangelbedingungen induziert und begünstigt auch eine Lokalisierung von MpkA im Zellkern (Jain *et al.*, 2011).

1.2.2 Regulation der intrazellulären Eisenkonzentration in *A. fumigatus*

Eisen ist, z.B. als Bestandteil von Eisen-Schwefel-Clustern, ein wichtiges Spurenelement für viele Prozesse der Zelle (Elektronentransport, Aminosäurenstoffwechsel, Biosynthese von DNA und Sterolen). Zu hohe Konzentrationen von Eisen wirken jedoch toxisch, da die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies gefördert wird (Halliwell & Gutteridge, 1984; Haas, 2012). Zwei wichtige Regulatoren der intrazellulären Eisenkonzentration in *A. fumigatus* sind HapX und SreA. Ist Eisen in ausreichenden Mengen vorhanden, verhindert der GATA-Transkriptionsfaktor SreA die Aufnahme und inhibiert die Siderophor-Biosynthese. Unter Eisenmangelbedingungen hemmt der bZIP-Transkriptionsfaktor HapX Eisen-abhängige Prozesse, sowie die Transkription von SreA (Hortschansky *et al.*, 2007; Schrettl *et al.*, 2008; Schrettl *et al.*, 2010). MpkA inhibiert die Biosynthese von Siderophoren und damit auch indirekt die Aufnahme von Eisen (Jain *et al.*, 2011).

2 *Streptomyces rapamycinicus*

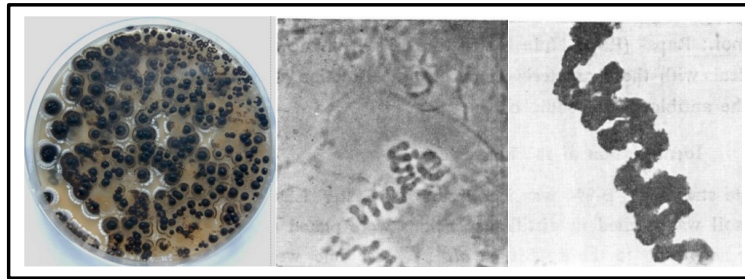


Abbildung 4: *S. rapamycinicus* auf Platte und spiralförmige Anordnung der Sporen

Links: V. Schroeckh, HKI Jena; Mitte und Rechts: Vezina *et al.* (1975)

Das Gram-positive Bakterium *Streptomyces rapamycinicus* wurde aus einer Bodenprobe von den Osterinseln (Rapa Nui) isoliert. Der Name bezieht sich auf die Fähigkeit Rapamycin zu produzieren (Vezina *et al.*, 1975; Kumar & Goodfellow, 2008). Die ursprüngliche Bezeichnung war *S. hygroscopicus*. Erst im Jahr 2008 wurde *S. rapamycinicus* als eigene Art beschrieben (Kumar & Goodfellow, 2008). Streptomyceten besitzen einen komplexen Entwicklungszyklus (Yagüe *et al.*, 2013a). Auf Festmedium bildet sich nach der Auskeimung der Sporen zunächst ein kompartmentiertes Myzel (MI), gefolgt von programmiertem Zelltod (Manteca *et al.*, 2005; Manteca *et al.*, 2006). Die überlebensfähigen Segmente dieses Myzels entwickeln sich zu einem vielkernigen, vegetativen Substratmyzel (MII). Mit der Zeit bildet sich eine hydrophobe Hülle, das reproduktive Luftmyzel entsteht. Erneut kommt es zu programmiertem Zelltod, der sowohl das Substrat- als auch das Luftmyzel betrifft (Wildermuth, 1970; Mendez *et al.*, 1985; Miguelez *et al.*, 1999; Manteca *et al.*, 2007). Aus dem überlebensfähigen Luftmyzel differenzieren die Sporen (Manteca *et al.*, 2007), diese sind oval und spiral-förmig angeordnet (Abbildung 4) (Vezina *et al.*, 1975; Kumar & Goodfellow, 2008). Sekundärmetabolite werden während der stationären Phase des Substratmyzels gebildet (Yagüe *et al.*, 2013b). Das Wachstum in Flüssig- und Festmedium unterscheidet sich kaum (Manteca *et al.*, 2008; Yagüe *et al.*, 2013a). Es kommt zur Ausbildung von MI und MII Myzel. Die Bildung von Sekundärmetaboliten (Antibiotika) findet während der MII-Phase statt (Manteca *et al.*, 2008). Unter Laborbedingungen dauert das MI-Stadium in Festmedium ca. 17 Stunden, in Flüssigmedium 48 Stunden (Manteca *et al.*, 2007; Manteca *et al.*, 2008). Im Erdreich dauern diese Phasen Monate (MI) bzw. Tage (MII) (Yagüe *et al.*, 2013a).

Durch Zellwand-Lyse im Rahmen des programmierten Zelltods während der Entwicklung von *Streptomyces* entsteht N-Acetylglukosamin (GlcNAc). Es fungiert als Signalmolekül für die

Sekundärmetabolit-Produktion (Chi *et al.*, 2011). GlcNAc ist die monomere Einheit von Polysacchariden wie dem Chitin. Es kommt auch als Bestandteil in der Zellwand von Pilzen und im Exoskelett von Insekten vor (Chen *et al.*, 2010).

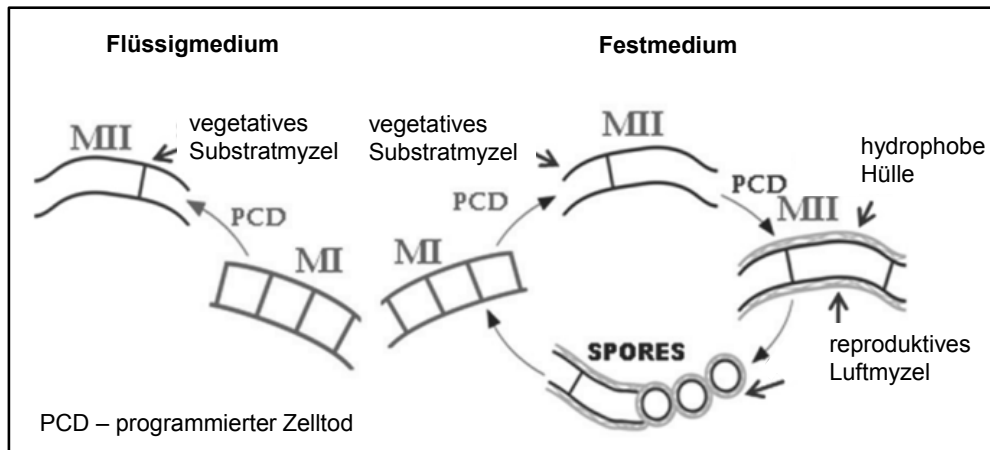


Abbildung 5: Entwicklungsstadien von Streptomyces

(Yagüe *et al.*, 2013a)

S. rapamycinicus wächst bei Temperaturen von 10 – 37 °C sowie einem pH-Wert von 6 – 10. Als Bodenbewohner kommt *S. rapamycinicus* auch in Kontakt mit organischem Pflanzenmaterial und anderen Bodenorganismen wie Pilzen. Eine Degradation von Cellulose, Chitin, DNA/RNA oder Pektin durch *S. rapamycinicus* konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Kumar & Goodfellow, 2008). Das von *S. rapamycinicus* produzierte Rapamycin wirkt antimikrobiell gegen *Candida albicans* sowie die Dermatophyten *Microsporum gypseum* und *Trichophyton mentagrophytes* (Sehgal *et al.*, 1975). Des Weiteren konnte die Produktion des Polyketids Elaiophylin und des Antibiotikums Nigericin nachgewiesen werden (Fang *et al.*, 2000). *S. rapamycinicus* ist phylogenetisch nahe verwandt mit *S. iranensis* (Hamedi *et al.*, 2010). Die Genom-Sequenz von *S. rapamycinicus* wurde 2013 publiziert (Baranasic *et al.*, 2013). Das Genom weist einen GC-Gehalt von 71 % auf (Kumar & Goodfellow, 2008), es ist 12,7 Mb groß und kodiert für ca. 10 000 Gene. Durch Auswertung der bioinformatischen Ergebnisse konnten 25 modulare Sekundärmetabolit-Gencluster, darunter 13 Typ I PKS- und 5 nichtribosomale Peptidsynthetasen (NRPS)-, sowie 7 weitere PKS/NRPS-Cluster identifiziert werden. Außerdem wurden noch 23 weitere Sekundärmetabolit-Gencluster anderen Typs beschrieben (Baranasic *et al.*, 2013).

Bakterien sekretieren Stoffe, um ihre Interaktionen mit der Umwelt zu modulieren (Tseng *et al.*, 2009). Gram-positive Bakterien verwenden dafür, neben Transportern, den allgemeinen

Sekretionssignalweg (Sec-Signalweg) bzw. den Zwei-Arginin-Signalweg (Tat-Signalweg) sowie die Sekretionssysteme Typ IV und VII (Tseng *et al.*, 2009). Die Sec- und Tat-Signalwege und das Sekretionssystem VII überbrücken nur die Zellumgrenzung des Bakteriums. Das Sekretionssystem IV überwindet zusätzlich die äußere Barriere der Wirtszelle (Tseng *et al.*, 2009). Neben Proteinen können auch Nukleinsäuren über das Sekretionssystem IV in Pflanzen- und Tierzellen transportiert werden (Christie & Cascales, 2005). Über welche Möglichkeiten der Sekretion *S. rapamycinicus* verfügt, ist bisher nicht beschrieben.

3 Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster

Sekundärmetabolite stellen eine natürliche Ressource für neue Medikamenten dar (Manteca *et al.*, 2008; Soliman & Raizada, 2013). Dabei wird die Produktion von vielen verschiedenen Stimuli aus der Umwelt wie dem pH-Wert des Bodens und der Temperatur, sowie vom Vorhandensein bzw. nicht Vorhandensein bestimmter Nährstoffe aktiviert (Calvo *et al.*, 2002). Oftmals sind die genauen Stimuli nicht bekannt, weshalb viele Sekundärmetabolite unter Laborbedingungen nicht produziert werden können (Bergmann *et al.*, 2007; Nett *et al.*, 2009; Wiemann & Keller, 2014). Deshalb spricht man auch von stillen Sekundärmetabolit-Genclustern. Es wurden verschiedene Methoden zur Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster entwickelt.

3.1 Molekularbiologische Methoden zur Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster

3.1.1 Interferenz mit der Chromatin-Struktur

Die Zugänglichkeit von Genen für die Transkriptionsmaschinerie wird unter anderem durch posttranslationale Modifikationen von Histon-Proteinen gesteuert. Zahlreiche Enzyme wie Methyltransferasen, Histonacetyltransferasen (HATs) und –deacetylasen (HDACs) sind an diesen Prozessen beteiligt (Hayes & Hansen, 2001; Peserico & Simone, 2011).

Die Verwendung von chemischen Substanzen, die die Aktivität dieser Enzyme beeinflussen, führte zur Identifizierung teilweise noch unbekannter Sekundärmetabolite. Der DNA-Methyltransferase-Hemmer 5-Azacytidin induzierte in *Cladosporium cladosporioides* die *de novo*-Synthese verschiedener Oxylipine, wichtige intra- und interspezies Signalmoleküle (Williams *et al.*, 2008) sowie die Bildung neuer Meroterpene (Atlantinone A und B) und Azaphilon in *Penicillium citreonigrum* (Wang *et al.*, 2010). Der HDAC-Inhibitor Suberoylanilid-

hydroxamsäure (SAHA) induzierte unter anderem die Bildung zweier bis dahin nicht charakterisierter Perylenquinone in *C. cladosporioides* (Williams *et al.*, 2008).

Im Überexpressionsstamm der Histonacetyltransferase EsaA in *A. nidulans* wird Lysin12 im Histon H4 vermehrt acetyliert und dadurch Sterigmatocystin, Penicillin und Terrequinon gesteigert produziert (Soukup *et al.*, 2012). Die Deletion des Gens *hdaA*, kodiert für eine HDAC, in *A. nidulans* führte zur Aktivierung von zwei telomer gelegenen Sekundärmetabolit-Genclustern sowie zur Produktion der bereits bekannten Metabolite Sterigmatocystin und Penicillin (Shwab *et al.*, 2007).

3.1.2 Überexpression von Regulatorproteinen/Promotor-Austausch

In Eukaryoten sind die Gene für die Biosynthese von Sekundärmetaboliten in Clustern lokalisiert (Gacek & Strauss, 2012). Durch Manipulation von Regulatorgenen innerhalb des Clusters kann die Aktivierung der Sekundärmetabolit-Produktion induziert werden. Durch Austausch des nativen Promotors im Regulatorgen gegen einen induzierbaren bzw. konstitutiv exprimierten kann die Aktivität aller Clustergene gesteuert werden. In *A. nidulans* konnte mit dieser Methode die Biosynthese der Aspyridone (Bergmann *et al.*, 2007) und Asperfuranon (Chiang *et al.*, 2009) aktiviert werden. Die Überexpression eines Transkriptionsfaktors führte auch in *Neosartorya fischeri* zur Entdeckung von Neosartoricin (Chooi *et al.*, 2013).

3.1.3 Heterologe Expression von Sekundärmetabolit-Genclustern

Für viele Sekundärmetabolit-Biosynthesen ist ein funktioneller Regulator nicht bekannt. Zudem konnte bereits mehrfach gezeigt werden, dass die Aktivierung eines Sekundärmetabolit-Genclusters die Expression anderer Sekundärmetabolit-Gene beeinflussen kann (Bergmann *et al.*, 2010; Gerke *et al.*, 2012; Wiemann *et al.*, 2013). Die heterologe Expression eines stillen Sekundärmetabolit-Genclusters ist deshalb eine weitere Methode zur Identifizierung neuer Metabolite und bietet den Vorteil der direkten Korrelation zwischen Gencluster und neu gebildeter Substanzen.

Die Arbeitsgruppe um Nihira kombinierte die heterologe Genexpression mit der Interferenz der Chromatin-Struktur. Für die heterologe Expression des Monacolin K-Clusters von *Monascus pilosus* und des Terrequinon A-Clusters von *A. nidulans* in *A. oryzae* wurde ein Stamm verwendet, in dem LaeA (globaler Regulator von Sekundärmetaboliten) induzierbar ist (Sakai *et al.*, 2012).

Der Sekundärmetabolit Aphidicolin wird von mehreren Pilzen, z.B. *Phoma betae* gebildet. Mittels heterologer Genexpression in *A. oryzae* konnte das Cluster bestätigt und die Biosynthese dieses Naturstoffes aufgeklärt werden (Fujii *et al.*, 2011).

Die heterologe Expression eines Sekundärmetabolit-Genclusters, konserviert in einigen Dermatophyten der Genera *Trichophyton* und *Arthroderma*, in *A. nidulans*, führte zur Bildung von Neosartoricin B. Dieser Metabolit ähnelt Neosartoricin von *Neosartorya fischeri* (Yin *et al.*, 2013) und war vorher für keine der Dermatophyten beschrieben.

Durch die Kombination einer *S. cerevisiae* in vivo-Klonierungstechnik und einer polyzistronischen mRNA des Penicillin-Genclusters von *Penicillium chrysogenum* war die heterologe Expression des kompletten Sekundärmetabolit-Genclusters in *A. nidulans* möglich (Unkles *et al.*, 2014). Für die Transformation wurde ein *A. nidulans*-Stamm verwendet, dessen endogenes Penicillin-Cluster deletiert war. Dies ermöglichte den Nachweis, dass das heterolog eingebrachte Penicillin-Cluster von *P. chrysogenum* in *A. nidulans* funktional ist.

3.2 Mikrobielle Interaktion – Mimikry physiologischer Bedingungen

Sekundärmetabolite regulieren in der Natur das Zusammenspiel der Lebewesen und somit der Mikroorganismen untereinander, sowie mit Pflanzen und Insekten (Rohlfes *et al.*, 2007; Scott *et al.*, 2008; Rohlfes & Churchill, 2011; Bertrand *et al.*, 2014). Im Erdboden findet ein steter Kampf um Nährstoffe und Lebensraum statt. Es ist somit naheliegend, dass viele Sekundärmetabolite gebildet werden, die einen Überlebensvorteil im Habitat gewährleisten (Tarkka *et al.*, 2009; Brakhage & Schroeckh, 2011; Frey-Klett *et al.*, 2011). Die gleichzeitige Kultivierung mehrerer Mikroorganismen führte deshalb auch bereits oft zur Identifizierung neuer Metabolite. Der Actinomycet *Salinispora arenicola* induziert in einer marinen *Emericella*-Spezies die Bildung der bis dahin nicht beschriebenen zyklischen Depsipeptide Emericellamide A und B. Diese zeigen antibakterielle Wirkung gegen *Staphylococcus aureus* (Oh *et al.*, 2007). Während der Kokultivierung des marinen Pilzes *Libertella* sp. mit dem marinen Bakterium *Thalassospira* sp. wurden vier neue Diterpenoide, Libertellenone A-D, gebildet (Oh *et al.*, 2005). Pestalon wird vom Pilz *Pestalotia* sp. produziert, wenn ein bisher nicht identifiziertes α -Proteobakterium anwesend ist (Cueto *et al.*, 2001). Glionitrin A wird während der Interaktion des Bakterium *Sphingomonas* sp. (Stamm KMK-001) mit *A. fumigatus* (Stamm KMC-901) gebildet und zeigt signifikante antibiotische Wirkung gegen eine Reihe von Mikroben, darunter Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* Stämme (Park *et al.*, 2009).

Viele bekannte Sekundärmetabolite werden von Streptomyceten produziert. Während der Kokultivierung von *A. fumigatus* mit *S. peucetius* ist jedoch der Pilz der Produzent der neu identifizierten Formylxanthocillin-Analoga Fumiformamid und N,N'-((1Z,3Z)-1,4-bis(4-Methoxyphenyl)buta-1,3-dien-2,3-diyl)diformamid (Zuck *et al.*, 2011).

In einem umfangreichen Kokultivierungsversuch wurde *A. nidulans* mit 58 verschiedenen Actinomyceten inkubiert. Eine Aktivierung des ansonsten stillen *ors*-Genclusters fand nur statt, wenn der Pilz mit *S. rapamycinicus* kultiviert wurde. Während der Interaktion kam es zur Produktion der fungalen Stoffe Orsellin- und Lecanorsäure sowie F9775A und F9775B. Die beiden erstgenannten Substanzen sind aus Flechten bekannte Moleküle (Schroeckh *et al.*, 2009; Honda *et al.*, 2010). Befand sich der Streptomycet während der Kokultivierung in einem Dialyse-Gefäß und wurde somit physikalisch von *A. nidulans* getrennt, wurden keine Orsellin- und Lecanorsäure gebildet. Für die Aktivierung des *ors*-Clusters war daher direkter Kontakt von *A. nidulans* und *S. rapamycinicus* notwendig. Durch die Verwendung des HAT-Inhibitors Anacardsäure konnte eine Aktivierung des *ors*-Clusters während der Interaktion unterdrückt werden. Der HDAC-Inhibitor SAHA induzierte dagegen die Transkription der *ors*-Gene auch bei Abwesenheit des Streptomyceten (Nützmann *et al.*, 2011). Dies deutet daraufhin, dass der Streptomycet die Modifikation von Histonproteinen beeinflusst. In weiteren Analysen konnte GcnE, Bestandteil des Saga/Ada-Komplexes, als essentielle HAT für die Aktivierung des *ors*-Clusters identifiziert werden (Reyes-Dominguez *et al.*, 2008; Nützmann *et al.*, 2011). GcnE acetyliert Histon H3 an den Lysinen 9 und 14. GcnE war für die Transkription der *ors*-Gene und die Produktion von Orsellin- bzw. Lecanorsäure essentiell (Nützmann *et al.*, 2011; Nützmann *et al.*, 2012).

3.3 Regulation und Funktion von Sekundärmetabolit-Genen

Die Signaltransduktion zur Aktivierung von Sekundärmetabolit-Genen ist weitgehend unerforscht. Die Verwendung von Chromatin-modifizierenden Substanzen (Williams *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) und die Generierung von Mutanten (Deletion bzw. Überexpression) von globalen Regulatoren der Sekundärmetabolit-Synthese wie LaeA (Bok & Keller, 2004; Perrin *et al.*, 2007), führte bereits zur Identifizierung neuer Substanzen. Auf dieser Grundlage kann die Identifizierung extrazellulärer Reize, involvierter Rezeptoren und weiterer Signaltransduktoren der Sekundärmetabolit-Synthese neue Einblicke in die physiologische

Funktion von Sekundärmetaboliten geben. Durch die Identifizierung weiterer, möglicherweise globaler Regulatoren, könnten weitere neue Sekundärmetaboliten identifiziert werden.

Der *Streptomyces*-Stamm AcH 505 unterscheidet bei der Bildung seiner Sekundärmetabolite spezifisch zwischen „Freund und Feind“. Die gemischte Kultivierung von *Streptomyces* AcH 505 mit dem Pilz *Amanita muscaria* führte zur Identifizierung des neuen Metaboliten Auxofuran. Dieser wird gebildet, um das Wachstum des Mykorrhiza-assoziierten Pilzes zu unterstützen. Die Entwicklung der Pflanzen-Pathogene *Armillariella obscura* und *Heterobasidion annosum* wird jedoch durch Bildung der Antibiotika WS-5995 B und C durch *Streptomyces* AcH 505 unterdrückt (Maier *et al.*, 2004; Riedlinger *et al.*, 2006). Auxofuran moduliert die Genexpression Wachstums-assoziiierter Gene, z. B. der Acetoacyl-CoA Synthetase *Aacs*, um das Wachstum von *A. muscaria* zu verbessern (Schrey *et al.*, 2005; Riedlinger *et al.*, 2006). Außer *Aacs* wird noch die Transkription von 58 weiteren Genen durch AcH 505 modifiziert, darunter auch Proteine von Signaltransduktionswegen, wie Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren (Schrey *et al.*, 2005). *Amanita muscaria* unterstützt die Bildung von Auxofuran durch Ansäuerung des umgebenden Mediums. Bei saurem pH werden die Wachstums-inhibierenden Substanzen WS-5995 B und C nicht gebildet (Riedlinger *et al.*, 2006).

Für die Interaktion von *B. subtilis* und *A. niger* konnte sogar eine veränderte Genexpression in beiden Interaktionspartnern nachgewiesen werden (Benoit *et al.*, 2014). Hauptsächlich werden in beiden Organismen antifungale und antibakterielle Verteidigungsmechanismen reduziert. Die Mikroorganismen detoxifizieren sich somit gegenseitig, was das Zusammenleben fördern könnte.

Die Virulenz von *Candida albicans* ist abhängig von der Morphologie. Die Hefeform ist vorrangig in kommensalen Interaktionen, die Hyphenform hingegen in opportunistischen Infektionen ausgebildet (Zore *et al.*, 2011). *Pseudomonas aeruginosa*, ein weiteres opportunistisches Pathogen, unterdrückt die Ausbildung der filamentösen Form von *C. albicans* durch ein zu Farnesol strukturell-ähnliches 3-Oxo-C12 Homoserinlacton (Hogan *et al.*, 2004). Farnesol ist ein Zell-Zell-Signalmolekül, das in *C. albicans* den Wechsel von der Hefe in die filamentöse Lebensform einleitet. Auch andere struktur-ähnliche Substanzen mit einer Kettenlänge von 12 C-Atomen hatte einen inhibierenden Effekt auf die Ausbildung der Hyphenform von *C. albicans* (Hogan *et al.*, 2004).

Diese Beispiele verdeutlichen, wie die Untersuchung von Kokulturen die physiologische Bedeutung von Sekundärmetaboliten offenbaren kann. Die Untersuchungen der *C. albicans* - *P. aeruginosa*-Interaktion lässt zudem Rückschlüsse auf mögliche Abläufe von Infektionsprozessen zu und ermöglicht dadurch vielleicht eine bessere medizinische Behandlung.

4 Ziel der Arbeit

Das Genom des humanpathogenen Saprophyten *Aspergillus fumigatus* kodiert für mehr als 20 Sekundärmetabolit-Gencluster. Viele dieser Gencluster sind still und werden unter Laborbedingungen nicht transkribiert. In ihrer natürlichen Umgebung sind Mikroorganismen Teil von Multispezies-Gemeinschaften. Die Bildung von Sekundärmetaboliten dient der Verteidigung und der Kommunikation. Die Interaktion der Mikroorganismen ist dabei der Auslöser für die Bildung dieser Naturstoffe. Die Erforschung der Signale, welche die Bildung von Sekundärmetaboliten induzieren und deren Regulation könnte die Ermittlung der physiologischen Funktionen dieser Naturstoffe ermöglichen. Zudem könnte durch die Identifizierung allgemeiner Regulatoren die Aktivierung weiterer Gencluster begünstigt werden. Bereits während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass in *Aspergillus fumigatus* ein stilles Gencluster durch Kokultivierung mit dem Streptomyceten *Streptomyces rapamycinicus* induziert wird. Während der Interaktion beider Organismen kam es zur Bildung neuer Metabolite durch den Pilz. Ziel dieser Arbeit war es, die Struktur und Biosynthese dieser Substanzen zu identifizieren und ihre Rolle in der Virulenz von *A. fumigatus* zu charakterisieren. Zudem sollte die Signalweiterleitung, die zur Aktivierung des stillen Genclusters in *A. fumigatus* führt, untersucht werden. Dabei wurde ein Schwerpunkt auf die Rolle der Mitogen-aktivierten Proteinkinase MpkA gelegt, da erste Hinweise deren Mitwirkung an der Regulation zeigten.

S. rapamycinicus aktivierte auch ein stilles Gencluster in *A. nidulans*. Es konnte gezeigt werden, dass die Histonacetyltransferase (HAT) GcnE für die Aktivierung dieses Clusters essentiell ist. Deshalb sollte untersucht werden, ob bei der Interaktion mit *S. rapamycinicus* die zu GcnE homologe HAT in *A. fumigatus* an der Aktivierung des stillen Genclusters beteiligt ist.

Durch eine Ähnlichkeits-Analyse sollte zudem geklärt werden, ob das während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* aktivierte Sekundärmetabolit-Gencluster einzigartig für *A. fumigatus* ist oder auch andere Organismen homologe Cluster besitzen.

Material und Methoden

1 Stämme und Materialien

1.1 Bakterien- und Pilz-Stämme

Die während dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Pilzstämme sind in Tabelle 1 und Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 1: Bakterien-Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5α	F ⁻ , <i>gyrA96</i> (Nal ^r), <i>recA1</i> , <i>relA1</i> , <i>endA1</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁺), <i>glnV44</i> , <i>deoR</i> , $\Delta(lacZYA-argF)$ U169 [ϕ 80d $\Delta(lacZ)$ M15]	Hanahan (1983)
<i>Streptomyces rapamycinicus</i> ATCC29253	Wildtyp	Vezina <i>et al.</i> (1975); Kumar and Goodfellow (2008)

Tabelle 2: Pilz-Stämme

Organismus	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>A. fumigatus</i>		
ATCC 46645	<i>A. fumigatus</i> Wildtyp	ATCC
CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80}	<i>A. fumigatus</i> , CEA17 <i>akuB</i> ^{KU80} :: <i>pyrG</i> ; PyrG ⁺ , CEA17 Δ <i>akuB</i>	da Silva Ferreira <i>et al.</i> (2006)
OE <i>fccR</i>	ATCC 46645, <i>Picl-fccR-Ticl</i> ; Hyg ^R	diese Arbeit,
Δ <i>fccR</i>	ATCC 46645 bzw. CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} ; 7G00130:: <i>ptrA</i> , PT ^R	diese Arbeit,
Δ <i>fccA</i>	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} , 7G00160:: <i>ptrA</i> , PT ^R	König (2009)
Δ <i>fccB</i>	OE <i>fccR</i> , 7G00120:: <i>ptrA</i> , PT ^R	diese Arbeit
Δ <i>fccC</i>	ATCC 46645 bzw. CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} ; 7G00150:: <i>ptrA</i> , PT ^R	diese Arbeit
Δ <i>fccD</i>	ATCC 46645 bzw. CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} ; 7G00170:: <i>ptrA</i> , PT ^R	diese Arbeit
Δ <i>fccE</i>	OE <i>fccR</i> ; 7G00180:: <i>ptrA</i> , PT ^R	diese Arbeit
Δ <i>gcnE</i>	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} ; <i>gcnE</i> :: <i>ptrA</i> ; PT ^R	diese Arbeit
Δ <i>mpkA</i>	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} ; <i>mpkA</i> :: <i>ptrA</i> ; PT ^R	Valiante <i>et al.</i> (2009)

Organismus	Relevanter Genotyp	Referenz
<i>mpkA</i> -T186A	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} , Δ <i>mpkA::mpkA</i> -T186A <i>hph</i> ; Hyg ^R PtrA ^R	V. Valiante, HKI Jena
<i>mpkA</i> -Y188F	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} , Δ <i>mpkA::mpkA</i> -Y188F <i>hph</i> ; Hyg ^R PtrA ^R	V. Valiante, HKI Jena
<i>mpkA</i> -TY186/188AF	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} , Δ <i>mpkA::mpkA</i> -TY186/188AF <i>hph</i> ; Hyg ^R PtrA ^R	V. Valiante, HKI Jena
Δ <i>ags1/2/3</i>	CEA17 Δ <i>akuB</i> ^{KU80} Δ <i>pyrG</i> ; <i>ags1::hph</i> , <i>ags2::ble</i> , <i>ags3::pyrG</i> ; Hyg ^R , Ble ^R , PyrG ⁺ ,	Henry <i>et al.</i> (2012)
Δ <i>hapX</i>	ATCC 46645; <i>hapX::hph</i> , Hyg ^R	Schrettl <i>et al.</i> (2010)
Δ <i>sreA</i>	ATCC 46645; <i>sreA::hph</i> , Hyg ^R	Schrettl <i>et al.</i> (2008)
<i>N. fischeri</i>		
NRRL 181	Wildtyp	JMRC
<i>A. clavatus</i>		
FSU 1270	Wildtyp	JMRC
<i>A. versicolor</i>		
FSU 6452	Wildtyp	JMRC
<i>A. oryzae</i>		
FSU 1447	Wildtyp	JMRC
<i>A. nidulans</i>		
A89	<i>biA1</i> , <i>argB2</i>	FGSC
An Δ <i>mpkA</i>	A89, <i>biA1</i> , AN5666:: <i>argB2</i>	JMRC

1.2 Medien und Zusätze

Die Zusammensetzungen der verwendeten Medien ist in Tabelle 3 und die verwendeten Medienzusätze sind in Tabelle 4 (Zusätze zu *E. coli*-Medien) und Tabelle 5 (Zusätze zu *A. fumigatus*-Medien) aufgelistet.

Tabelle 3: Anzuchtmedien für *E. coli*, *S. rapamycinicus* und *Aspergillus spp.*

Nährmedium	Bestandteile	Konzentrationen/Mengen
<i>E. coli</i>		
LB-Medium (Miller, 1972)	Trypton Hefeextrakt NaCl (Agar) pH 7,5	10 g/l 5 g/l 10 g/l (15 g/l)
<i>S. rapamycinicus</i>		
NB-Medium	Nährbouillon (Merck)	25 g/l

Nährmedium	Bestandteile	Konzentrationen/Mengen
Hafermehl-Agar (Shirling & Gottlieb, 1966)	Hafermehl Agar	10 g/l 15 g/l
M79-Medium (Prauser & Falta, 1968)	Glukose Bacto-Pepton Casaminosäuren Hefeextrakt NaCl pH 7,2	10 g/l 10 g/l 1 g/l 2 g/l 6 g/l
Erdkultur	Lehm (vom Ofensetzer) Sand Blumenerde Leitungswasser 3 x autoklaviert (über 8 Tage)	50 g 50 g 75 g 75 ml
<i>Aspergillus</i>		
<i>Aspergillus</i> -Minimal-Medium (AMM) (Pontecorvo <i>et al.</i> , 1953)	NaNO ₃ KH ₂ PO ₄ KCl pH 6,5 (Agar) autoklavieren 20 % (w/v) Glukose 20 % (w/v) MgSO ₄ Hutner's Spurenelemente	6 g/l 1,52 g/l 0,52 g/l (15 g/l)
1000 x Hutner's Spurenelemente	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O FeSO ₄ x 7 H ₂ O CuSO ₄ x 5 H ₂ O MnCl ₂ x 4 H ₂ O H ₃ BO ₃ (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ x 4 H ₂ O CoCl ₂ x 6 H ₂ O Na ₂ EDTA aufkochen, auf 60 °C abkühlen, pH 6,5-6,8 mit KOH einstellen, steril filtrieren	22 g/l 5 g/l 1,6 g/l 5 g/l 11 g/l 1,1 g/l 1,6 g/l 50 g/l
Malzextrakt-Medium	Malzextrakt Hefeextrakt Glukose NH ₄ Cl K ₂ HPO ₄	20 g/l 2 g/l 10 g/l 0,25 g/l 0,25 g/l
Czapek-Dox-Medium	Difco™ Czapek-Dox Broth (BD)	35 g/l

Tabelle 4: Zusätze zu *E. coli*-Medien

Substanz	Funktion	Endkonzentration
Ampicillin	Antibiotikum	100 µg/ml

Tabelle 5: Zusätze zu *A. fumigatus*-Medien

Substanz	Funktion	Endkonzentration
SAHA	HDAC-Inhibitor	4 mM
Anacardsäure	HAT-Inhibitor	10 µM, 100 µM
Pyriithiamin	Antibiotika	0,1 µg/ml
Hygromycin	Antibiotika	240 µg/ml
Glukose	Kohlenstoffquelle	40 mM
Acetat	Kohlenstoffquelle	100 mM
KCl	Stabilisator der Osmolarität	0,6 M
Sorbitol	Stabilisator der Osmolarität	1 M

1.3 Lösungen und Puffer

Alle verwendeten und selbst hergestellten (nicht Bestandteil eines Kits) Lösungen und Puffer sind in Tabelle 6 aufgeführt.

Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer

Lösung/Puffer	Bestandteil	Menge/Konzentration
PBS	NaCl	8 g/l
	KCl	0,2 g/l
	Na ₂ HPO ₄	1,44 g/l
	KH ₂ PO ₄	0,24 g/l
TBS	NaCl	150 mM
	Tris	50 mM
	pH 7,5	
Glycerin-Konservierungsmedium	K ₂ HPO ₄	12,6 g/l
	Na-Citrat	0,9 g/l
	MgSO ₄	0,18 g/l
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,8 g/l
	KH ₂ PO ₄	3,6 g/l
	Glycerol	88 g/l
Lyse-Puffer (DNA-Extraktion)	Tris, pH 7	50 mM
	SDS	3 %
	EDTA	50 mM
Lyse-Puffer (Protein-Extraktion)	Glycerin	10% (v/v)
	Tris-HCl, pH 7.5	50 mM
	Triton X-100	1% (v/v)
	NaCl	150 mM

Lösung/Puffer	Bestandteil	Menge/Konzentration
	SDS	0.1% (w/v)
	EDTA	5 mM
	Na-Fluoride	50 mM
	Na-Pyrophosphat	5 mM
	β-Glyzerophosphat	50 mM
	Na-Orthovanadat	5 mM
	PMSF	1 mM
	Protease-Inhibitor	Roche
<i>A. fumigatus</i>-Transformation		
Wasch-Lösung	KCl	0,6 M
	Tris, pH 7	10 mM
Resuspensionspuffer	KCl	0,6 M
	Tris, pH 7,5	10 mM
	CaCl ₂	50 mM
25 %-ige PEG-Lösung	PEG 8000	25 % (w/v)
	Tris, pH 7,5	10 mM
	CaCl ₂	50 mM
Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen		
50 x TAE	Tris-Acetat	2 M
	EDTA	50 mM
	pH 8,5	
5 x RNA-Puffer	MOPS	200 mM
	Na-Acetat	50 mM
	EDTA	10 mM
	autoklavieren	
RNA-Ladepuffer	5 x RNA-Puffer	4 ml
	37 % (v/v) Formaldehyd	1,4 ml
	Formamid	5 ml
	6 x Loading Dye (Fermentas)	0,8 ml
	Ethidiumbromid	20 µl
	50 % (v/v) Glycerin	0,8 ml
Nachweis von Nukleinsäuren		
Depurinierungslösung	HCl	0,25 M
Denaturierungslösung	NaCl	1,5 M
	NaOH	0,5 M
20 x SSC	NaCl	3 M
	Na-Citrat	0,3 M
	pH 7	

Lösung/Puffer	Bestandteil	Menge/Konzentration
Hybridisierungspuffer	SSC	5 x
	SDS	0,1 % (w/v)
	Dextransulfat	50 g/l
	Western Blocking Reagent (Roche)	0,5 x
Maleinsäure-Puffer	Maleinsäure	0,1 M
	NaCl	0,15
	pH 7,5 (NaOH Pellets)	
Wasch-Puffer	Maleinsäure-Puffer	0,1 M
	Tween 20	0,3 % (v/v)
Blockierungslösung	Maleinsäure-Puffer	0,1 M
	Western Blocking Reagent (Roche)	1x
Antikörper-Lösung	Blockierungslösung	1 : 20 000
	Anti-DIG-AP,	
	Fab-Fragments (Roche)	
Detektionslösung	Tris	0,1 M
	NaCl	0,1 M
	pH 9,5	

1.4 Plasmide

Die verwendeten Plasmide sind in Tabelle 7 aufgelistet.

Tabelle 7: Verwendete Plasmide

Plasmid	Relevanter Genotyp/Phänotyp	Referenz
pJET1.2/blunt	Amp ^R , rep (pMB1), eco47IR	Fermentas
pUChph	Amp ^R , Hyg ^R	Liebmann <i>et al.</i> (2004)
pUC18_iclP	Amp ^R , Picl	Behnsen <i>et al.</i> (2010)
pCAPsic/T1	Amp ^R , Ticl	V. Schroeckh, HKI Jena
peYFP-c-mut-pyrithiamin	Amp ^R , PT ^R , eYFP	V. Schroeckh, HKI Jena
pUC_OEfccR	Amp ^R , Hyg ^R , Picl, fccR, Ticl	diese Arbeit

1.5 Oligonukleotide

Die nachfolgend aufgeführten Oligonukleotide wurden zur Klonierung, Herstellung von Hybridisierungssonden und Deletionskonstrukten verwendet.

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Zielgen/Verwendung
oVS 401	GCA TGG ACG CTC AGA AGA ACA GAG	AFUA_7G00110
oVS 402	GTA TTC ATT AGA GAG GCC TTG CAT CCC	AFUA_7G00110

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Zielgen/Verwendung
oVS 403	GGT CCT GCA GTC GAA CAA CAT CTC C	AFUA_7G00120, <i>fccB</i>
oVS 404	CGA CTT GTA ACA GAC CCG TGC TGC	AFUA_7G00120, <i>fccB</i>
oVS 405	GTG GTC AGG CCG CAT GGA CAC TG	AFUA_7G00130, <i>fccR</i>
oVS 406	GGA CGC TGA ATT GCT TCC TCC TGG	AFUA_7G00130, <i>fccR</i>
oVS 407	GCT TCC CGT CTC CCA ATC CTT ATT ATC	AFUA_7G00150, <i>fccC</i>
oVS 408	GTG GGG ATC CGC TTT GCT TCC TC	AFUA_7G00150, <i>fccC</i>
oVS 409	CTA CGA GGC TGA GGA TAT TGA ATG GG	AFUA_7G00160, <i>fccA</i>
oVS 410	GCA CCA TAG TCT CCG TGA ACC CAG	AFUA_7G00160, <i>fccA</i>
oVS 411	AGT TGA ATG GCA AAA GCC GTG GCA C	AFUA_7G00170, <i>fccD</i>
oVS 412	CTC CGA TGG TCA TGA CAG TTG CAA TG	AFUA_7G00170, <i>fccD</i>
oVS 413	GTG AAC TCG CTA TCC AAC AAG GCC AC	AFUA_7G00180, <i>fccE</i>
oVS 414	CTC CGC TAC CTG TCG ATA ACT CCC	AFUA_7G00180, <i>fccE</i>
oVS 415	CGG TAC GTT TCC CGA ATG GAG GTG	AFUA_7G00190
oVS 416	CAA GCA GCC AAT GAC ATC AAC CTC G	AFUA_7G00190
<i>fccR</i> -fwd-up1	AGC ATT TCC AGG CGA ATC CGA C	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
<i>fccR</i> -fwd-up2	AGG CAG GAA CAC AGA ATC GCT GAC	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
<i>fccR</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG ACC AGC	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
	CAT GTT CTA GTT GCT TCG	
<i>fccR</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG GGT GGC	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
	TGG GCG TGA GTT AAT GTC	
<i>fccR</i> -rev-down5	GCA GAC TTG AGC ATA GTA CTC CGT G	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
<i>fccR</i> -rev-down6	TGC CAA GAT TAG TGA GAG TCC CAG	Δ AFUA_7G00130, Δ <i>fccR</i>
PTR-fwd	CGA TAA GCT TGA TGG CCT AGA TGG	PT ^R -Kassette
PTR-rev	CCA GAA AGA GTC ACC GGT CAA AGC	PT ^R -Kassette
oVS 665	CTG CAG TCG AAC AAC ATC TCC ATC	„Southern blot“ Δ <i>fccR</i>
<i>fccB</i> -fwd-up1	TTG CTG CTG AAA TCG GCC CAC	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
<i>fccB</i> -fwd-up2	GCG ACA GGT GAC ATG AGT GGT CAG	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
<i>fccB</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG ATA ATG	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
	CCG TGT GCT CGC CGT C	
<i>fccB</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG CGC AGA	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
	CGA TTG TAG TAT GAT GAG	
<i>fccB</i> -rev-down5	TTC TGC CCA AGC ACA TCA ACG AC	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
<i>fccB</i> -rev-down6	CCA GAA GGT CAG AAG ACC GTG GTC	Δ AFUA_7G00120, Δ <i>fccB</i>
<i>fccC</i> -fwd-up1	CGA TGG ACA GGG ATA CAG ACC ACG	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>
<i>fccC</i> -fwd-up2	AGG AGC GAA CAC GAG GAT GAG AC	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>
<i>fccC</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG CAT CGA	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>
	ACG AAG GGT TGC TGG AG	
<i>fccC</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG GGA TCG	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>
	GAT TTT GCA TGA AGG CTC G	
<i>fccC</i> -rev-down6	TGG ATT GAC AGC GTC TCG CAC C	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>
<i>fccC</i> -rev-down5	GGA GCA AAT TGT GGG CAT GGT TGG	Δ AFUA_7G00150, Δ <i>fccC</i>

Oligonukleotid	Sequenz (5' - 3')	Zielgen/Verwendung
<i>fccD</i> -fwd-up1	CAT ACG TGC TGA TGT TCT GCG AG	Δ AFUA_7G00170, Δ <i>fccD</i>
<i>fccD</i> -fwd-up2	AGC CTG CAA GCC ATA CCA ACG	Δ AFUA_7G00170, Δ <i>fccD</i>
<i>fccD</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG GCG TTC GTT GCG CGT TTT ACA ATC	Δ AFUA_7G00170, Δ <i>fccD</i>
<i>fccD</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG CGT CCG CAA TAC TTT GCC AGC	Δ AFUA_7G00170, Δ <i>fccD</i>
<i>fccD</i> -rev-down5	TAC CGC CAA GCT ATC GCT CAC	Δ AFUA_7G00170 Δ <i>fccD</i>
<i>fccD</i> -rev-down6	CAA GCC GAG AAG CAA AAC GAG G	Δ AFUA_7G00170, Δ <i>fccD</i>
<i>fccE</i> -fwd-up1	GAT GCT CTT TGC CGT TCC CTC C	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
<i>fccE</i> -fwd-up2	TTC TGC AAG ACC TCA CCA CCA CG	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
<i>fccE</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG TCG TAT CTG CGT CAC TGG TCC TG	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
<i>fccE</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG GGA CTC TGC CGC GCT ATA TAC C	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
<i>fccE</i> -rev-down5	AAT TGG CCC CTG CGA CCT AAC C	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
<i>fccE</i> -rev-down6	TGC GCC AAT CAG TCA CGA CAA C	Δ AFUA_7G00180, Δ <i>fccE</i>
oVS 706	GTG CTG CCT ACG GAT AGA TGG TC	„Southern blot“ Δ <i>fccR</i>
<i>fccR</i> -rev- <i>XhoI</i>	TAG AAG CTC GAG CTC ACG CCC AGC CAC CAA ACA	Überexpression AFUA_7G00130, OE <i>fccR</i>
<i>fccR</i> -fwd- <i>NsiI</i>	GTG CAT ATG CAT GAG AGA CGC AGT CCA TCT AAG GAA G	Überexpression AFUA_7G00130, OE <i>fccR</i>
<i>icl</i> -Term- <i>NsiI</i> -fwd	GAT GTC ATG CAT GCA CTG AGA TGG TGG ATA GTC AAG	Überexpression AFUA_7G00130, OE <i>fccR</i>
<i>icl</i> -Term- <i>SapI</i> + <i>NcoI</i> -rev	CTG GTA CCA TGG AAG CGG AAG AGC GA TCC TGC TAA GAC CGC AGT AG	Überexpression AFUA_7G00130, OE <i>fccR</i>
oVS 714	GTG CAT GCA TGA GAG ACG CAG TC	„Southern blot“ OE <i>fccR</i>
oVS 715	AGG CAC ACC TGA TGC ACA CAG ATC	„Southern blot“ OE <i>fccR</i>
oVS 720	ACC GCC TGC CTG AAT CAG AAT ATG	AFUA_7G00090
oVS 721	GCC TAG CCT GGA TTG CCT ATG AT	AFUA_7G00090
<i>gcnE</i> -fwd-up1	GCA ACT AAG ACA GAC CGA CGC AG	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>
<i>gcnE</i> -fwd-up2	CCA TTG TGA GCG AGA GCG ATA G	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>
<i>gcnE</i> -rev-up3	CCA TCT AGG CCA TCA AGC TTA TCG GGA CTC GTG CTG ACT TTG TCA TAG C	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>
<i>gcnE</i> -fwd-down4	GCT TTG ACC GGT GAC TCT TTC TGG GAT ATA AAC ACG CCT AGC TCG CAG	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>
<i>gcnE</i> -rev-down5	CTG TAT CAC CCT GGT CTC CTC TGC	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>
<i>gcnE</i> -rev-down6	CGT AAG TTG TCA GAT CGC AGG TCG	Δ AFUA_4G12650, Δ <i>gcnE</i>

2 Kultivierung von Mikroorganismen

2.1 Kultivierung von *E. coli*

Für die Anzucht von *E. coli* wurde LB-Medium mit Ampicillin als Selektionsmarker verwendet. Zur Plasmid-Isolierung wurden Zellen einer Einzelkolonie in 3 ml LB-Medium (mit 100 µg/ml Ampicillin) 16 h bei 37 °C und 200 Umdrehungen pro Minute (Upm) inkubiert.

2.2 Kultivierung von *S. rapamycinicus*

2.2.1 Kultivierung in Flüssigmedium

Zur Gewinnung von Myzelmaterial für die Kokultivierung mit *Aspergillus spp.* wurde M79 mit 1×10^7 Sporen/ml angeimpft und für 66 – 68 h bei 28 °C und 140 Upm inkubiert.

2.2.2 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Sporensuspensionen

Ein ca. 0,5 x 0,5 cm großes Stück einer mit *S. rapamycinicus* bewachsenen, versporteten Hafermehl-Agarplatte wurde in ein Röhrchen mit sterilisierter Erde (Erdkultur) überführt und bei 28 °C kultiviert. Die Myzelausbreitung im Erdreich wurde mikroskopisch überprüft. Myzel-enthaltende Erde wurde anschließend auf Hafermehl-Agar-Platten überführt. Nach 2 - 3 Wochen bei 28 °C wurden die Sporen mit PBS geerntet. Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 3 min bei 1000 Upm pelletiert.

Sporen-Konzentrationen wurden mit einer Thoma-Kammer (Marienfeld, 0,00025 mm³) ausgezählt. Die Sporensuspension wurde in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin-Konservierungsmedium gemischt, in Cryo.sTM-Röhrchen (greiner bio-one) á 5 x 10⁸ Sporen abgefüllt und stufenweise eingefroren (je 30 min bei Raumtemperatur, 4 °C, -20 °C) und anschließend bei -80 °C gelagert (nicht länger als ein Jahr). 100 µl der Sporensuspension wurden für 24 h in NB-Medium kultiviert und mikroskopisch auf Kontamination untersucht.

2.3 Kultivierung von *A. fumigatus*

2.3.1 Kultivierung in Flüssigmedium

100 ml AMM (Glukose als C-Quelle) wurde mit 4×10^8 Sporen beimpft und für 16 h bei 37 °C und 200 Upm in einem 250 ml-Erlenmeyerkolben inkubiert (Vorkultur). Anschließend wurde das Myzel durch Filtration durch Filtergaze vom Kulturüberstand getrennt und in frisches AMM überführt (Hauptkultur). Die Induktion der Überexpression von *fccR* (in OE*fccR*, Δ *fccB*

und $\Delta fccE$) erfolgte durch Verwendung von 100 mM Acetat im Medium. Für die Gliotoxin-Produktion wurde Czapek-Dox-Medium (Difco) verwendet.

2.3.2 Herstellung und Konzentrationsbestimmung von Sporensuspensionen

Aspergillus spp. wurden zur Herstellung von Sporensuspensionen auf AMM-Agarplatten mit Glukose als C-Quelle kultiviert. Die $\Delta ags1/2/3$ -Mutante wurde auf Malz-Agarplatten kultiviert. Nach 5 bis 7 Tagen wurden die Sporen mit doppelt destilliertem, sterilisiertem Wasser abgeschwemmt und verbleibende Myzelbestandteile durch Passage durch ein Zellsieb mit einer Porengröße von 40 μm entfernt. Die Sporen-Konzentrationen wurden mit einer Thoma-Kammer (Marienfeld, 0,00025 mm^3) bestimmt. Zur Herstellung von Konserven wurde Sporensuspension in einem Verhältnis von 1:1 mit Glycerin gemischt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert.

2.4 Kokultivierung von *S. rapamycinicus* mit *Aspergillus spp.*

Wenn nicht anders aufgeführt, wurden für die Kokultivierungsexperimente mit *S. rapamycinicus* AMM mit Glukose als C-Quelle verwendet. *Aspergillus spp.* wurden für 16 h in AMM, der *A. nidulans* $\Delta mpkA$ -Stamm für 30 h und *S. rapamycinicus* für 66 – 68 h in M79 vorkultiviert. Der Pilz wurde in 50 ml frisches Medium überführt und mit 1/20 Volumen *S. rapamycinicus* versetzt. Die Kokultivierung wurde bei 200 Upm und $37\text{ }^\circ\text{C}$ durchgeführt. Proben zur Bestimmung der Transkriptlevel wurden nach 3 h (bzw. 4 h) entnommen, die Metabolite nach 24 h mittels HPLC analysiert.

Für die Bestimmung des Phosphorylierungsgrades von MpkA wurde die Hauptkultur für 1 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 200 Upm kultiviert bevor *S. rapamycinicus* zugegeben wurde. Enthielt die Hauptkultur Anacardsäure wurde *S. rapamycinicus* erst nach einer einstündigen Einwirkzeit zugesetzt.

2.5 Gliotoxin-Bildung

250 ml Czapek-Dox-Medium wurden mit 2×10^7 Sporen von CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ bzw. von $\Delta gcnE$ in 1l-Erlenmeyerkolben inokuliert. Die Kultivierung erfolgte bei 160 Upm und $28\text{ }^\circ\text{C}$ für 6 Tage. Die Gliotoxin-Produktion wurde mit HPLC bestimmt.

2.6 Bestimmung der Auskeimungsrate

50 µl AMM mit einer Konzentration von 1×10^6 Sporen/ml wurden auf ein Deckgläschen gegeben und anschließend in einer feuchten Kammer bei 37 °C inkubiert. Mit der Bestimmung der ausgekeimten Sporen wurde nach 3 Stunden begonnen. Die Auszählung erfolgte stündlich bei 400-facher Vergrößerung in Triplikaten (3 Sichtfelder). Dabei wurde der Anteil der gekeimten Sporen an der Gesamtzahl der im Sichtfeld vorhandenen Sporen bestimmt.

3 Molekularbiologische Methoden

3.1 Isolierung von Nukleinsäuren

3.1.1 Isolierung von Plasmid-DNA

Die Isolierung wurde mit den NucleoSpin® Plasmid EasyPure bzw. NucleoBond® XtraMidi Kits von Macherey-Nagel nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.1.2 Isolierung genomischer DNA

Myzel einer Übernacht-Kultur wurde in flüssigem Stickstoff gemörsert, anschließend in Lyse-Puffer aufgenommen und für 20 min bei 65 °C inkubiert. Nach 5 min Abkühlung auf Eis wurde der Mix mit ½ Volumen MPC-Reagenz (Epicentre) versetzt. Zellbestandteile wurden anschließend bei 10 min und 13.000 Upm pelletiert. Die Fällung der genomischen DNA im Überstand erfolgte mit Isopropanol. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in zweifach destilliertem Wasser aufgenommen.

3.1.3 Isolierung von RNA

Myzel einer Kultur wurde über Filtergaze (Miracloth, Calbiochem) vom Kulturüberstand abgetrennt, trocken gepresst und ein ca. 8 x 8 mm großes Stück in ein ZR BashingBead™ Lysis Gefäß (The Epigenetics Company) mit Keramik-Perlen (Durchmesser 0,5 mm) gefüllt. Nach Zugabe von 1 ml TRIsure (Bioline) wurde das Myzel im FastPrep FP120 (MP Biomedicals) für 20 s bei Stufe 4 aufgeschlossen. Anschließend wurden 200 µl Chloroform zugegeben, gemischt und für 15 min bei 13.000 Upm zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde mit Isopropanol in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Nach erneuter Zentrifugation für 10 min bei 13.000 Upm wurde das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in DEPC-behandeltem Wasser (Bioline) aufgenommen.

3.1.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen

Die Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte gelelektrophoretisch. Die DNA-Fragmente gesuchter Größe wurden aus dem Gel geschnitten und mit dem „Gel DNA Recovery Kit“ (Zymoclean) nach den Angaben des Hersteller gereinigt.

3.1.5 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von RNA und Plasmid-DNA wurde mit dem „Nanodrop ND-1000 Spektrophotometer“ (Thermo) bestimmt. Die benötigte DNA-Menge für die „Southern blot“-Analyse wurde mit einem 3 µl-Aliquot gelelektrophoretisch abgeschätzt.

3.2 Enzymatische Modifikationen von Nukleinsäuren

3.2.1 Restriktionsverdau

Es wurden Restriktionsenzyme der Firma New England BioLabs nach den Vorgaben des Herstellers verwendet. Zum Test auf Integration und Orientierung vom Insert in den Vektor wurden Restriktionsansätze in einem Maßstab von 10 – 20 µl und 300 – 400 ng DNA verwendet. Für weitere Klonierungsschritte bzw. zur Transformation von *A. fumigatus* wurden Restriktionsreaktionen bis 40 µl mit 1 – 2 µg bzw. 10 µg DNA angesetzt.

3.2.2 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden mit dem „Rapid Ligation Kit“ bzw. dem CloneJET™ PCR Cloning Kit (beide Fermentas) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.2.3 Amplifikation mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Amplifizierung der Deletions- und Überexpressionskonstrukte erfolgte mit dem „Phusion™ Flash High-Fidelity PCR Master Mix“ (Finnzymes) nach den Angaben des Herstellers. Für PCRs zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation wurde „MyTaq™ Red Mix“ (Bioline) verwendet.

„BIOTAQ™ Red“ DNA Polymerase (Bioline) sowie Digoxigenin-11-dUTPs (Roche) zusätzlich zu den dNTPs wurden für die Generierung von Hybridisierungssonden verwendet.

3.3 Generierung von Deletionskonstrukten

Für die Generierung der Deletionskonstrukte wurde die 3-Fragment-PCR verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Bei dieser Methode werden 1 – 1,5 kb große Fragmente im 5′- und 3′-

Bereich des zu deletierenden Gens amplifiziert. Je ein Primer eines jeden Primer-Paares (ein Primer-Paar pro Flanke) besitzt dabei zusätzliche 22 bp identisch zu den Enden der Pyriithiamin-Resistenz-Kassette (PT^R-Kassette). Die PT^R-Kassette wurde mit den Primern oVS663 und oVS664 amplifiziert. In einer weiteren PCR, die alle 3 DNA-Fragmente als Matrize enthielt, kam es durch die komplementären Sequenzen zur Bindung. Die Polymerase synthetisierte die Deletionskassette basierend auf den gebundenen 3 DNA-Fragmenten. Während der Transformation des Ausgangsstammes wird das zu deletierende Gen mittels homologer Rekombination der 5'- und 3'- Bereiche der Deletionskassette und des Wildtyp-Locus durch das Pyriithiamin-Gen *ptrA* ersetzt.

3.4 Generierung des *fccR*-Überexpressionsstammes (OE*fccR*)

Das Gen *fccR* wurde mit dem Primer-Paar oVS 708 + 709 amplifiziert. Der Primer oVS 708 enthält zusätzlich zur Sequenz homolog zur 5'-Region des Gens die Schnittstelle für *XhoI*, oVS 709 für *NsiI*. Es wurden zudem Promotor und Terminator des Isocitratlyase-Gens (Afu4g13510, *icl*) verwendet. Die Promotorregion (*Picl*) wurde mit *Sall* und *SapI* aus pUC18_*Picl* geschnitten und die Terminator-Region (*Ticl*) mit den Primern oVS 710 + 711 aus dem Plasmid pCAP*sicIT1* amplifiziert. Alle 3 DNA-Fragmente wurden in den Vektor pUC*hph* eingebracht, wobei das Plasmid pUC_OE*fccR* entstand. Das *fccR*-Gen wurde dabei unter die Kontrolle des *icl*-Promotors gestellt. Die Transkription des *fccR*-Gens war daher durch Zugabe von Acetat zum Medium induzierbar. Die Resistenz gegen Hygromycin (Hyg^R) wurde als Selektionsmarker verwendet. Der Ausgangsstamm für die Transformation war ATCC 46645.

3.5 Transformation von Mikroorganismen

3.5.1 Transformation von *E. coli*

Es wurden kompetente DH5α-Zellen verwendet. 80 µl des *E. coli*-Stammes wurden mit 10 µl des Ligationsansatzes (ca. 150 – 300 ng DNA) gemischt für 30 min auf Eis und anschließend für 2 min bei 42 °C inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch zu 30 µl und 60 µl auf LB-Amp-Agarplatten ausplattiert und bei 37 °C inkubiert.

3.5.2 Transformation von *A. fumigatus*

Die Transformation von *A. fumigatus* wurde nach dem Protokoll für die *A. nidulans*-Transformation (Ballance & Turner, 1985) in abgewandelter Form durchgeführt. Dafür wurde Myzel einer Übernachtskultur über Filtergaze vom Kulturüberstand getrennt und anschließend

die Zellwand in 20 ml 0,6 M KCl mit 2,4 g Vano Taste Pro (Novozymes) bei 30 °C und 80 Upm enzymatisch verdaut. Die Protoplastierung wurde mikroskopisch überprüft. Noch unverdaute Myzel-Reste wurden über Filtergaze abgetrennt und das Filtrat 1 x mit 0,6 M KCl und anschließend, 2 x mit Wasch-Lösung gewaschen. Die Zentrifugation zwischen den Waschschritten wurde für 3 min bei 4.000 Upm durchgeführt. Die Protoplasten wurden in 500 µl Resuspensionspuffer aufgenommen. Anschließend wurden 100 µl Protoplasten mit 25 µl 25 %-iger PEG-Lösung und 3 - 10 µg DNA (in max. 10 µl) gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Der Kontrolle wurde steriles H₂O statt DNA zugesetzt. Danach wurden beiden Ansätzen weitere 500 µl 25 %-ige PEG-Lösung zugegeben und für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde je 1 ml Resuspensionspuffer zugefügt und die Ansätze auf mehrere Agarplatten mit 1 M Sorbitol oder 0,6 M KCl als Stabilisator verteilt. Neben den Stabilisatoren wurde dem Agar noch Hygromycin bzw. Pyrimethamin zugesetzt. Die Positivkontrolle enthielt weder DNA im Transformationsansatz noch Hygromycin bzw. Pyrimethamin im Medium. Der Negativkontrolle wurde Hygromycin oder Pyrimethamin, jedoch keine DNA beigefügt. Sorbitol wurde als Osmoregulator verwendet, wenn Hygromycin (Transformation von *OEfccR*) und KCl wenn Pyrimethamin bei Transformationen als Selektionssubstanz (sämtliche Deletionsstämme) verwendet wurde. Die Agarplatten wurden anschließend für 2 – 5 Tage bei 37 °C inkubiert.

3.6 Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarose-Gelen

Für die Auftrennung von DNA wurden 1 % (w/v)-ige Agarose-Gele sowie 1 x TAE als Ladepuffer verwendet. Den Proben wurde vor dem Auftragen $\frac{1}{6}$ Volumen „Loading Dye“ (Fermentas) zugesetzt. Als Größenmarker wurde der „GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder“ (Thermo Scientific) verwendet.

Zur Auftrennung von RNA wurden 1,2 % (w/v)-ige Agarose-Gele und 1 x RNA-Puffer verwendet. 10 µg RNA wurden mit Ladepuffer in einem Verhältnis 1:1 gemischt für 15 min bei 65 °C erhitzt und anschließend im Gel für 1 – 2 h bei 90 V aufgetrennt.

3.7 Nachweis von Nukleinsäuren

3.7.1 „Southern blot“

Die Menge verwendeter genomischer DNA wurde mittels 3 µl-Aliquot in einem Agarose-Gel abgeschätzt, mit dem jeweiligen Restriktionsenzym über Nacht verdaut und für 2 – 3 Stunden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel 2 x 15 min in

Depurinierungslösung und 2 x 20 min in Denaturierungslösung gewaschen. Der Transfer der DNA auf eine Nylon-Membran Hybond™-N⁺ (GE Healthcare) erfolgte mit 0,4 M NaOH für 2,5 Stunden. Die Membran wurde kurz in 2 x SSC gewaschen und anschließend für 1 h in 20 ml Hybridisierungs-Puffer bei 60 °C prähybridisiert. Anschließend wurden in dieselbe Lösung 300 – 700 ng Digoxigenin-markierte, denaturierte Hybridisierungssonde hinzugegeben und es wurde über Nacht inkubiert. Die Membran wurde am nächsten Tag für 2 x 5 min mit 1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS und 2 x für 20 min mit 0,5 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS gewaschen. Bei Raumtemperatur wurde anschließend für 5 min mit Wasch-Puffer je 30 min mit Blockierungslösung und Antikörper-Lösung, sowie weitere 2 x für 15 min mit Wasch-Lösung gewaschen. Zum Schluss wurden die Membranen so lange mit Detektionslösung gespült bis keine Schaumbildung mehr auftrat. Die Membran wurde anschließend zwischen zwei Lagen Klarsichtfolie gelegt und „CDP-star, ready to use“ (Roche) tropfenweise um die Membran verteilt. Nach 5 min Inkubation im Dunkeln wurde überschüssige CDP-star-Lösung gründlich entfernt. Die Entwicklung und der Nachweis der DNA-Fragmente wurden mit „Fuji Medical X-Ray Film“-Röntgenfilmen (FUJIFILM Corporation) sowie dem ECL-Entwickler CURIX 60 (AGFA) durchgeführt.

3.7.2 „Northern blot“

10 µg RNA wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Gel anschließend 2 x 20 min in 10 x SSC gewaschen. Der Transfer der RNA auf die Nylon-Membran Hybond™-N⁺ (GE Healthcare) erfolgte über Nacht mit 10 x SSC. Die Membran wurde anschließend kurz in 2 x SSC gewaschen und die RNA durch UV-Licht von 0,12 Joule/cm² im „UV Crosslinker UVC 500“ (Hoefer) kovalent an die Membran gebunden. Die Prähybridisierung, die Inkubation mit der Digoxigenin-markierten Hybridisierungssonde, die Waschschrte und die Detektion mit „Fuji Medical X-Ray Film“-Röntgenfilmen wurden, wie für den „Southern blot“ beschrieben, durchgeführt.

3.8 Nachweis von Proteinen – „Western blot“

Für den „Western blot“ wurde das Myzel zu den entsprechenden Zeiten vom Kulturmedium über Filtergaze abgetrennt, mit Papiertüchern getrocknet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Anschließend wurde das Myzel mit Mörser und Pistill zu einem feinem Puder verarbeitet. Die Protein-Isolierung erfolgte durch Zugabe von Lysepuffer (inklusive PMSF) in

einem Verhältnis von 1:1 und einer anschließenden Inkubation für 5 min. Nachfolgend wurden die Proben für 15 min bei maximaler Stufe zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit dem Bradford-Assay bestimmt. 15 µg Protein wurden für 40 min und 200 V gelelektrophoretisch (12% (w/v) SDS–PAGE (Invitrogen)) aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Milipore Immobilon-P) für 50 min bei 12 V (BIO RAD Transfer blot SD – semidry transfer cell) übertragen. Die Membran wurde anschließend für 1 h in 1 x TBS, 5 % (w/v) Milchpulver, 0.1 % (v/v) Tween prähybridisiert und anschließend über Nacht bei 4 °C mit dem Primärantikörper (1:500 Verdünnung) inkubiert. Am nächsten Tag wurde 3 x 15 min mit 1 x TBS, 0.1 % (v/v) Tween gewaschen und anschließend mit dem Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase (HRP)-konjugiert an Ziege-Anti-Kaninchen IgG) für 1 h inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mittels LumiGLO-Reagenzien (Santa Cruz Biotechnology).

4 Biochemische Methoden

4.1 Extraktion und Isolation

Die Aufarbeitung der Kulturen erfolgte durch M. G. Schwinger und C. Karkowski aus der Abteilung BMC des HKI, Jena.

Die Extraktion der Kulturen erfolgte mit Ethylacetat. Die Extrakte wurden mit Natriumsulfat getrocknet und konzentriert. Anschließend wurden die Extrakte in 1 ml Methanol gelöst.

Für die Isolierung von Fumicyclin A wurde eine 20 l-Kokultur über eine Sephadex LH-20-Säule gereinigt und die Fumicyclin-enhaltene Fraktion mittels präparativer HPLC isoliert.

4.2 HPLC-, MS- und NMR-Analyse

Die HPLC-, MS- und NMR-Analysen wurden von Mitarbeitern der BMC am HKI, Jena durchgeführt.

Die analytische HPLC wurde an einem „Shimadzu LC-10Avp series HPLC System“ bestehend aus einem Autosampler, Hochdruckpumpen, einem Säulenofen und PDA durchgeführt. Die Analyse wurde mit einer C18-Säule (Eurospher 100-5, 250 x 4.6 mm) und einer Gradienten-Elution (MeCN/0.1 % (v/v) TFA 0.5/99.5 in 30 min zu MeCN/0.1 % (v/v) TFA 100/0, MeCN 100 % für 10 min; Durchflussrate 1 ml/min; Injektionsvolumen: 20 µl) durchgeführt.

Die LC-MS-Messungen wurden mit einem Exactive Orbitrap High Performance Benchtop LC-MS mit einer Elektrospray-Ionenquelle und einem Accela HPLC System (Thermo Fisher

Scientific, Bremen) durchgeführt (HPLC-Bedingungen: C18-Säule (Betasil C18 3 µm 150 x 2.1 mm) und Gradienten-Elution (MeCN/0.1 % (v/v) HCOOH (H₂O) 5/95 für 1 min, bis zu 98/2 in 15 min, dann 98/2 für weitere 3 min; Durchflussrate 0.2 ml/min; Injektionsvolumen: 3 µl). Die präparative HPLC wurde an einem Shimadzu LC-8a series HPLC-System mit DAD durchgeführt (Phenomenex Synergi 4 µm Fusion-RP 80A, 250 x 21.2 mm, Gradienten-Modus MeCN/0.01 % (v/v) TFA 50/50 in 30 min zu MeCN/0.01 % (v/v) TFA 83/17, MeCN 83 % für 10 min, Durchflussrate 10 ml/min).

Die MS/MS-Messungen wurden am Exactive Orbitrap Massenspektrometer mit einer Elektrospray Ionenquelle (Thermo Fisher Scientific, Bremen) oder einem TSQ Quantum AM Ultra-Gerät (Thermo Fisher Scientific, Bremen) durchgeführt.

Präparative HPLC erfolgte mit einem Shimadzu LC-8a HPLC-System (Shimadzu, Duisburg). NMR-Spektren wurden mit einem Bruker Avance DRX 600 (Bruker Daltonic, Bremen) aufgenommen und gegen die Signale der restlichen Lösungsmittel normalisiert.

5 Durchlichtmikroskopie

Mikroskopische Aufnahmen wurden am Leica DM 4500B-Fluoreszenzmikroskop mit einer Leica DFC 480-Kamera (Leica Microsystems, Wetzlar) sowie einem Binokular (Zeiss, Stemi 2000-C mit einer Canon PowerShot G5 5 Megapixel Kamera) aufgenommen.

Um eine genauere Betrachtung der Konidiophoren zu ermöglichen, wurde Sporenmaterial des Wildtyps und des *ΔgcnE*-Stammes auf AMM-Agar ausplattiert und anschließend sterilisierte Deckgläschen in unterschiedlichen Winkeln im Agar platziert. Während der Kultivierung bei 37 °C für 6 Tage wuchs das Myzel mit den Konidiophoren an den Deckgläschen empor. Anschließend wurden die Deckgläschen wieder entfernt, auf einem Objektträger gelegt und mikroskopisch analysiert.

6 Datenbanken

Die Sequenzinformationen für die Generierung von Deletionskonstrukten und des Überexpressionsstammes wurden dem Central *Aspergillus* Data REpository (CADRE; www.cadre-genomes.org.uk) entnommen.

Die Gen- und Proteinsequenzen für die Suche nach orthologen Genclustern in anderen Mikroorganismen wurden von der *Aspergillus* Genome Database (AspGD; www.aspgd.org) bezogen und die Analyse mit dem Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST;

blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (Altschul *et al.*, 1990) angefertigt. Für das Nukleotid-gegen-Nukleotid-Sequenzalignment wurde blastn (einigermaßen ähnliche Sequenz) und für die Suche nach ähnlichen Proteinsequenzen blastp (Protein-Protein BLAST) verwendet.

Für die Analyse der Domänenstrukturen der *fcc*-kodierte Proteine wurde „NCBI conserved domains“ genutzt, das als Teil der BLAST-Suche zur Verfügung stand.

7 Mausinfektionsmodell

Das Experiment wurde von Dr. M. Straßburger und C. Schult am HKI, Jena durchgeführt.

Für das Infektionsexperiment wurden für jeden Stamm 10 pathogen-freie weibliche „outbreed“ CD-1-Mäuse mit einem Gewicht von 18-20 g und einem Alter von 6-8 Wochen (zur Verfügung gestellt von Charles River, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden unter Standardkonditionen mit individuell belüfteten Käfigen untergebracht und mit normalem Mäusefutter und Wasser versorgt.

Die Immunsuppression erfolgte durch zweimalige Gabe von je 25 mg Cortisonacetat drei Tage und direkt vor der Infektion (Tag 0) durch intraperitoneale Injektion. Nach der Anästhesie wurden die Mäuse mit den verschiedenen *A. fumigatus* – Stämmen durch nasale Gabe von 2×10^5 Konidien in 20 µl PBS infiziert. Das Gewicht und der Gesundheitszustand der infizierten Mäuse wurden zweimal täglich überprüft.

Alle Tiere wurden nach den Richtlinien der Europäischen Tierschutzverordnung behandelt und von der zuständigen Bund-/Länder-Behörde und Ethikkommission in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz genehmigt.

Material infizierter Mäuselungen bzw. der PBS-Kontrolle wurden in Paraffin eingebettet, in 4 µm breite Scheiben geschnitten, mit Periodsäure-Leukofuchsin angefärbt und mittels Durchlichtmikroskopie analysiert.

Ergebnisse

1 Kokultivierung des Pilzes *Aspergillus fumigatus* mit dem Bakterium *Streptomyces rapamycinicus*

1.1 Einfluss von *Streptomyces rapamycinicus* auf die Metabolit-Produktion von *Aspergillus fumigatus*

Die Analyse von Genomsequenzen offenbarte das große Potenzial von Mikroorganismen, Sekundärmetabolite zu produzieren (Craney *et al.*, 2013). Oftmals werden diese Metabolite in Monokulturen jedoch gar nicht oder nur in geringen Mengen gebildet (Scherlach *et al.*, 2013). Die Kokultivierung von Mikroorganismen ist eine vielfach angewendete Methode, die Bildung neuer Substanzen bzw. bereits bekannter in erhöhtem Maße zu induzieren (Schroeckh *et al.*, 2009; Bertrand *et al.*, 2014).

Auch *A. fumigatus* wurde in Kokultur auf die Produktion neuer Substanzen hin untersucht. Als Interaktionspartner wurde der Streptomycet *Streptomyces rapamycinicus* gewählt, da dieser bereits in *A. nidulans* die Bildung von Substanzen induzierte, die in der Monokultur nicht nachweisbar waren (Schroeckh *et al.*, 2009). Wurde *A. fumigatus* in AMM für 24 h kultiviert, blieb der Kulturüberstand farblos. Die gemeinsame Kultivierung mit *S. rapamycinicus* führte jedoch bereits nach ca. 3 h zu einer gelblich-braunen Färbung des Überstandes (Abbildung 6). Schon während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass diese Färbung von einer Reihe von Sekundärmetaboliten verursacht wurde.

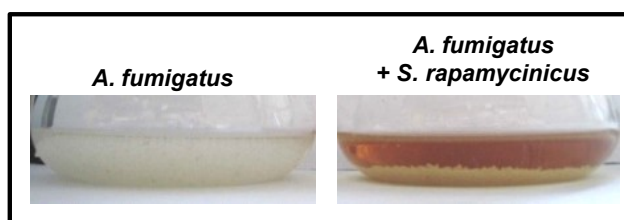


Abbildung 6: Färbung einer *A. fumigatus*-Kultur bzw. Kokultur mit *S. rapamycinicus* nach 24 h in AMM

Zu dieser Zeit habe ich zudem den Einfluss von *S. rapamycinicus* auf die Genexpression von *A. fumigatus* untersucht. Dafür wurden Microarrays einer *A. fumigatus* - *S. rapamycinicus*-Kokultur und einer *A. fumigatus*-Einzelkultur verwendet und die Daten analysiert. Es konnte ein Sekundärmetabolit-Gencluster identifiziert werden, das in der Kokultur hochreguliert war. Dieses Cluster ist im telomeren Bereich des kurzen Armes von Chromosom 7 lokalisiert und

umspannt die Genloci AFUA_7G00120 bis AUFUA_7G00180 (Abbildung 8). In einer *A. fumigatus*-Einzelkultur war für diese Gene keine Transkription nachweisbar. Das im Cluster lokalisierte Gen AFUA_7G00160 kodiert für eine Polyketidsynthase (PKS). Der Kulturüberstand des PKS-Deletionsstammes in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* ist farblos und im Metabolitprofil fehlt im Vergleich zur Einzelkultivierung von *A. fumigatus* eine Gruppe von Substanzen (König, 2009). Die Ergebnisse der Transkriptionsstudien und der Analyse des *pks*-Deletionsstammes belegten, dass ein Zusammenhang zwischen der Transkription des Sekundärmetabolit-Genclusters, der Gelbfärbung des Überstandes und der Substanz-Gruppe im Metabolitprofil der Kokultur besteht. Im Cluster sind neben der PKS zudem Gene, die putativ für einen Transkriptionsfaktor, eine Metallo- β -Lactamase ähnliche Thioesterase, eine Monooxygenase, eine Dimethylallyltryptophansynthase (DMAT) und eine Epimerase bzw. Dehydratase kodieren. Die Produkte dieses Sekundärmetabolit-Genclusters wurden als Fumicycline bezeichnet. Gereinigte Fumicycline sind gelb (persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach; HKI Jena). Diese Beobachtung korreliert mit der Gelbfärbung des Überstandes in der Kokultur. Die Aufreinigung einzelner Fumicycline war auf Grund von Tautomerisierungen und Instabilität schwierig (persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach). Jedoch war die Isolierung und Strukturaufklärung zweier Derivate (Fumicyclin A und B) in Kooperation mit Dr. K. Scherlach (HKI, Jena) möglich (Abbildung 7). Bei Fumicyclin A und B handelt es sich um Meroterpenoide, dies sind Polyketide mit terpenem Anteil (Kaysser *et al.*, 2012). Fumicyclin A hat eine molekulare Masse von 424 Da, die Summenformel ist $C_{24}H_{24}O_7$. Das Vierring-System von Fumicyclin A entsteht wahrscheinlich aus dem trizyklischen Fumicyclin B durch Abspaltung von H_2O (persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach).

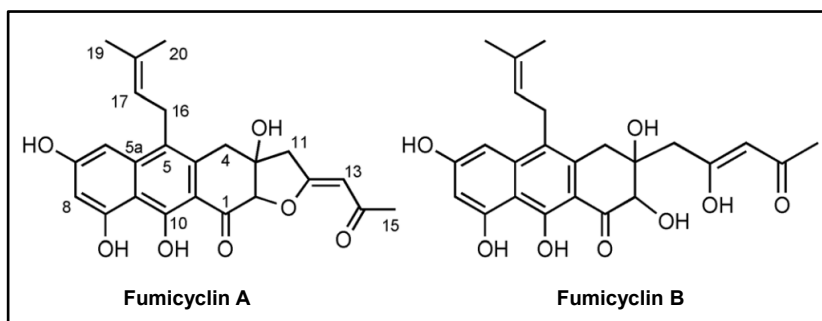


Abbildung 7: Struktur der Fumicycline A und B

Fumicycline sind Meroterpenoide, besitzen also einen Polyketid- und einen Terpen-Anteil. Fumicyclin A hat eine Summenformel von $C_{24}H_{24}O_7$, eine molekulare Masse von 424 Da und entsteht durch Wasserabspaltung aus Fumicyclin B.

Die im Fumicyclin-Cluster lokalisierten Gene wurden *fccB* (AFUA_7G00120), *fccR* (AFUA_7G00130), *fccC* (AFUA_7G00150), *fccA* (AFUA_7G00160), *fccD* (AFUA_7G00170) und *fccE* (AFUA_7G00180) genannt. Die Anordnung der Gene innerhalb des Clusters ist in Abbildung 8 dargestellt. Die annotierten Funktionen der Gene sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

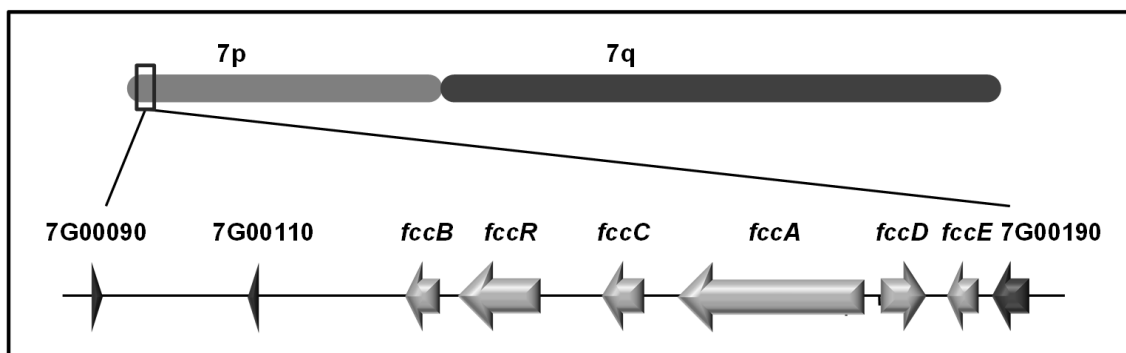


Abbildung 8: Organisation der Fumicyclin-Biosynthesegene

Aufbau des Fumicyclin-Clusters (hellgraue Pfeile). Das Gen *fccA* kodiert für eine Polyketidsynthase (PKS). Im Cluster ist zudem ein Gen für einen putativen C6 Transkriptionsfaktor (TF, *fccR*) sowie für eine Metallo- β -Lactamase ähnliche Thioesterase (*fccB*), eine Monooxygenase (*fccC*), eine Dimethylallyltryptophansynthase (DMAT, *fccD*) und eine Epimerase/Dehydratase (*fccE*) lokalisiert. Das Sekundärmetabolit-Gencluster ist am telomeren Ende des kurzen Armes von Chromosom 7 (7p) lokalisiert.

Tabelle 9: Auflistung der Gene des Fumicyclin-Clusters

Aufgeführt sind die Gen-Loci, die Gennamen und die annotierten Enzyme des Fumicyclin-Clusters.

Gen-Locus	Name	Kodiertes Enzym
AFUA_7G00120	<i>fccB</i>	Metallo- β -Lactamase ähnliche Thioesterase
AFUA_7G00130	<i>fccR</i>	Zn(II) ₂ Cys ₆ Transkriptionsfaktor
AFUA_7G00150	<i>fccC</i>	FAD-abhängige Monooxygenase
AFUA_7G00160	<i>fccA</i>	Polyketidsynthase
AFUA_7G00170	<i>fccD</i>	Dimethylallyltryptophansynthase
AFUA_7G00180	<i>fccE</i>	NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase

Die PKS stellt das Schlüsselenzym der Fumicyclin-Biosynthese dar. Welche Schritte der Biosynthese von den anderen Proteinen des Sekundärmetabolit-Clusters katalysiert werden, wurde im Rahmen dieser Dissertation untersucht.

1.2 Rolle der *fcc*-Gene bei der Fumicyclin-Biosynthese

1.2.1 Identifizierung des Regulators der Fumicyclin-Biosynthese

Nach der Identifizierung des Fumicyclin-Clusters als Ursprung für die Metabolite, die den Überstand der Kokultur von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* gelb färbten, wurde überprüft, ob im Cluster ein Gen für den Regulator der Fumicyclin-Biosynthese lokalisiert ist. Die Durchsicht von Gendatenbanken wie Central *Aspergillus* Data REpository (CADRE, www.cadre-genomes.org.uk), *Aspergillus* Genome Database (AspGD, www.aspergillusgenome.org) und *Aspergillus* Comparative Database (www.broadinstitute.org) bestätigte *fccR* (AFUA_7G00130) als putativen Transkriptionsfaktor der *fcc*-Gene. Das Gen *fccR* besteht aus 2472 Nukleotiden (nt) und enthält zwei Intronen. Eine Domänenanalyse der 774 Aminosäuren (AS) der Protein-Sequenz (mit „NCBI conserved domains“, www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) offenbarte eine Zn²⁺- und eine DNA-Bindedomäne eines GAL4-ähnlichen Zn₂Cys₆-Transkriptionsfaktors.

Um herauszufinden, ob dieser Transkriptionsfaktor der Regulator der im Cluster lokalisierten *fcc*-Gene und damit der Fumicyclin-Biosynthese ist, wurde ein *fccR*-Deletionsstamm ($\Delta fccR$) im Stamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ generiert (Abbildung 9). Dafür wurde die 3-Fragment-PCR bzw. Fusions-PCR (Szewczyk *et al.*, 2006) verwendet. Am Beispiel der *fccR*-Deletion wird das Prinzip dieser Methode erklärt. Die Bereiche am 3'- und 5'-Ende (nachfolgend als Flanken bezeichnet) des *fccR*-Gens wurden mit den Primerpaaren *fccR*-fwd-up1/*fccR*-rev-up3 und *fccR*-fwd-down4/*fccR*-rev-down6 amplifiziert. Zur Herstellung der Pyrithiamin-Resistenzkassette wurden PTR-fwd und PTR-rev verwendet. Die Resistenzkassette enthält das Gen *thiA* aus *Aspergillus oryzae* unter der Kontrolle des nativen Promotors. Die Primer *fccR*-rev-up3 und *fccR*-rev-down6 weisen neben der Genomsequenz spezifisch für *fccR* noch die 24 bp auf, die identisch zum Anfang bzw. zum Ende der Pyrithiamin-Resistenzkassette sind. Dadurch entstehen Fragmente (Flanken und Resistenzkassette) mit überlappenden Sequenzen. Diese dienen in einer Fusions-PCR als Template mit *fccR*-fwd-up2/*fccR*-rev-down5 als Primerpaar. *fccR*-fwd-up2 und *fccR*-rev-down5 sind „nested“-Primer, d. h. sie binden innerhalb der Flanken. Sie wurden so gewählt, dass jede Flanke dennoch ca. 1 kb groß ist. Die Pyrithiamin-Resistenzkassette hatte eine Größe von ca. 2 kb. Für die Amplifizierung der Flanken wurde genomische DNA (gDNA) von *A. fumigatus* und für die Pyrithiamin-Resistenzkassette das Plasmid peYFP-c-mut-pyrithiamin verwendet.

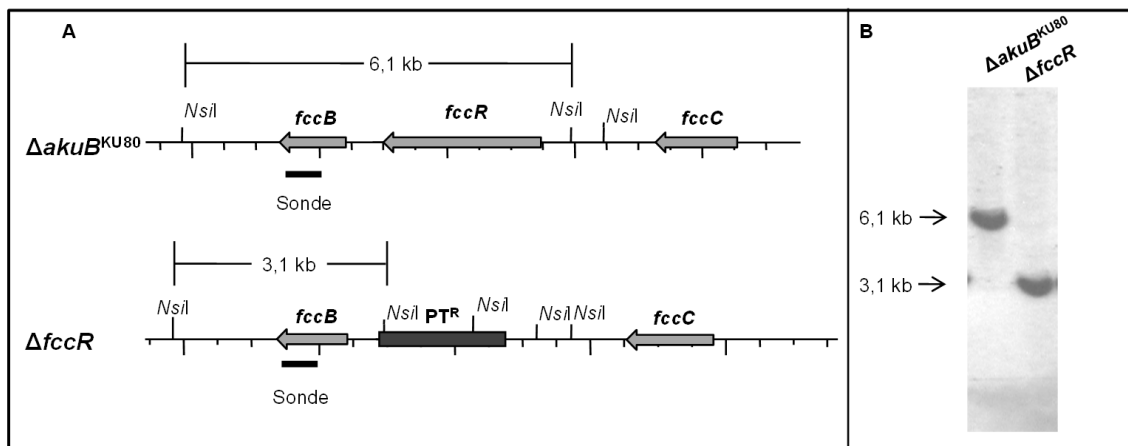


Abbildung 9: Deletion des Transkriptionsfaktorgens *fccR*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Rezipienten-Stamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$) sowie im *fccR*-Deletionsstamm ($\Delta fccR$). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *NsiI* sowie die Größen der erwarteten Banden. Als Marker wurde die Pyrimidinaminresistenz-Kassette (PTR) verwendet. **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des Transkriptionsfaktorgens ($\Delta fccR$).

Um zu zeigen, dass es sich bei FccR um den Transkriptionsregulator der *fcc*-Gene handelt, wurde der Einfluss der *fccR*-Deletion auf das Transkriptlevel der anderen im Cluster lokalisierten Gene mit einem „Northern blot“ untersucht (Abbildung 10). Dafür wurden Sporen von CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ und des $\Delta fccR$ -Stammes in AMM für 16 h kultiviert. Anschließend wurde das Myzel in neues Medium überführt, um sicherzustellen, dass keine Nährstofflimitation vorliegt. Mit Zugabe von *S. rapamycinicus* zu CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ bzw. zum $\Delta fccR$ -Stamm startete die Kokultivierung. Nach 3 h wurde das Transkriptlevel der *fcc*-Gene in CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ und im $\Delta fccR$ -Stamm bestimmt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da es bereits Experimente für die Interaktion von *S. rapamycinicus* und *A. nidulans* gab und die Transkriptlevel dort ebenfalls nach 3 h bestimmt wurden (Schroeckh *et al.*, 2009). Dies sollte eine Vergleichbarkeit der Experimente ermöglichen. Zudem konnte ich bereits während meiner Diplomarbeit zeigen, dass das Cluster bereits 1 h nach Zugabe des Streptomyceten aktiv ist und Transkripte für ca. 9 h nachweisbar sind (König, 2009). Zusätzlich wurde nach 24 h Stunden von der Kokultur und der Kontrolle das Metabolitprofil mit HPLC von Dr. K. Scherlach (HKI, Jena) bestimmt.

In CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ fand eine Aktivierung der *fcc*-Gene statt. Für alle Gene des Clusters (*fccB*, *fccR*, *fccC*, *fccA*, *fccD*, *fccE*) waren nach 3 h Transkripte detektierbar (Abbildung 10). Im $\Delta fccR$ -Stamm waren während der Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* jedoch für keines der *fcc*-Gene Transkripte nachweisbar (Abbildung 10).

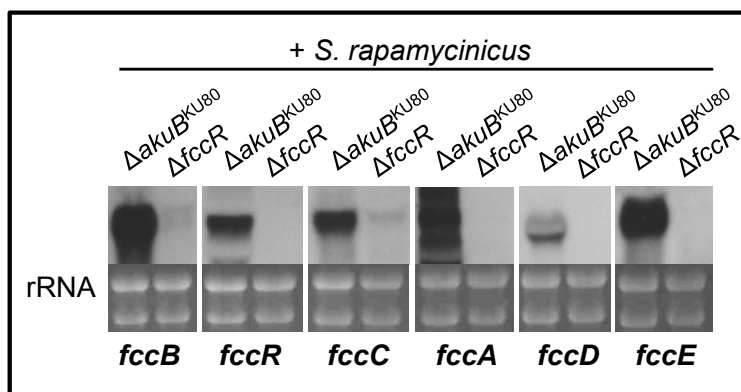


Abbildung 10: Transkriptmenge der *fcc*-Gene des Fumicyclin-Clusters im $\Delta fccR$ -Stamm

Der Rezipientenstamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$) und der *fccR*-Deletionsstamm ($\Delta fccR$) wurden mit *S. rapamycinicus* für 3 h kultiviert und anschließend die Transkriptmenge der Fumicyclin-Biosynthesegene (bezeichnet als *fccB*, *fccC*, *fccA*, *fccD*, *fccE*) bestimmt. Die 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Wurde der $\Delta fccR$ -Stamm mit *S. rapamycinicus* kokultiviert, fehlte die typisch gelbliche Färbung des Kulturüberstandes und es konnten keine Fumicycline durch HPLC nachgewiesen werden (Abbildung 11, persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach). Demzufolge kodiert der *fccR*-Locus für den Transkriptionsfaktor der *fcc*-Gene und ist essentiell für die Biosynthese der Fumicycline.

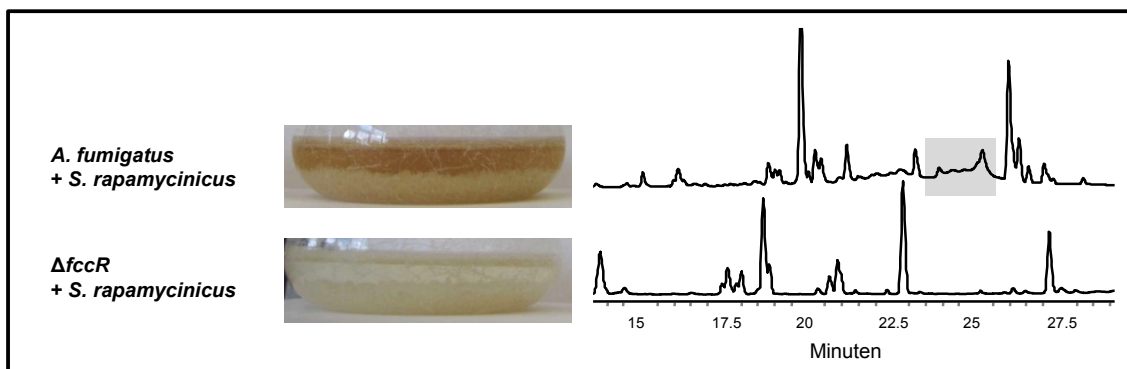


Abbildung 11: Metabolit-Produktion des *fccR*-Deletionsstammes

A. fumigatus und der *fccR*-Deletionsstamm ($\Delta fccR$) wurden in AMM mit *S. rapamycinicus* für 24 h kultiviert und das Metabolitprofil wurde durch HPLC bestimmt. Der Bereich mit den Fumicyclinen ist grau hinterlegt. Im $\Delta fccR$ -Stamm waren keine Fumicycline nachweisbar.

Um zu testen, ob FccR ausreichend für die Aktivierung des *fcc*-Clusters und die Fumicyclin-Biosynthese ist, wurde ein *fccR*-Überexpressionsstamm (*OEfccR*) des Stammes ATCC 46645 generiert (Abbildung 12). Dafür wurde das Gen *fccR* mit dem Primerpaar *fccR*-fwd-*NsiI*/*fccR*-rev-*XhoI* amplifiziert. Als Template diente gDNA. Das entstandene Fragment hatte an den Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *NsiI* und *XhoI*. Weiterhin wurde der

Terminator der Isocitratlyase (*Ticl*) mit den Primern *icl*-Term-*Nsil*-fwd und *icl*-Term-*SapI*+*NcoI*-rev amplifiziert. Als Template diente das Plasmid pCAP*sic*/T1 (zur Verfügung gestellt von Dr. V. Schroeckh, HKI Jena). *fccR* wurde unter die Kontrolle des Promotors der Isocitratlyase (*Picl*) von *A. fumigatus* gestellt. Dieser ist durch Acetat im Medium induzierbar. *Picl* wurde über *SalI* und *SapI* aus dem Plasmid pUC18_*icP* (Behnsen *et al.*, 2010) geschnitten. Das amplifizierte *fccR*-Gen wurde über die angegebenen Schnittstellen zusammen mit *Picl* und *Ticl* in das Plasmid pUC*hph* (Liebmann *et al.*, 2004) kloniert. Dadurch entstand das Überexpressionsplasmid pUC_OE*fccR* (Abbildung 12). Als Resistenzmarker zur Transformation des OE*fccR*-Überexpressionskonstruktes wurde Hygromycin verwendet. Das *hph*-Gen unter der Kontrolle des konstitutiven Promotors der Glycerinaldehyd-3-Phosphatdehydrogenase aus *A. nidulans* (*PgpdA*) und der Terminator waren bereits in pUC*hph* enthalten. Für die Transformation von *A. fumigatus* wurde pUC_OE*fccR* mit *SapI* und *NotI* geschnitten. Nur das DNA-Fragment, bestehend aus *fccR* mit Promotor und Terminator sowie der *hph*-Kassette, wurde durch Transformation in ATCC 46645 eingebracht. Die Integration des Überexpressions-Konstruktes erfolgte ektopisch. Alle getesteten OE*fccR*-Mutanten wiesen neben der Wildtyp-Bande bei ca. 2 kb mindestens eine Integration des OE*fccR*-Konstruktes auf (Abbildung 12C).

Der Einfluss der Überexpression des Regulatorgens *fccR* auf die Transkriptlevel der *fcc*-Gene und auf die Fumicyclin-Produktion wurde untersucht. Dafür wurden unter anderem verschiedene Kokultivierungsexperimente durchgeführt (Abbildung 13). Der Überexpressionsstamm und ATCC 46645 als Kontrolle wurden unter „normalen“ Bedingungen in AMM (mit Glukose als C-Quelle) und unter induzierenden Bedingungen in AMM mit Acetat (als alleiniger C-Quelle) mit bzw. ohne *S. rapamycinicus* kultiviert. In AMM färbte sich weder der Überstand des Wildtyps noch des OE*fccR*-Stammes in der Einzelkultur gelb (Abbildung 13). Auch der Kulturüberstand des Wildtyps unter induzierenden Bedingungen (AMM mit Acetat) blieb farblos. Damit konnte gezeigt werden, dass Acetat als Bestandteil des Mediums die Fumicyclin-Produktion nicht induziert. Enthielt die Einzelkultur des OE*fccR*-Stammes Acetat bzw. in der Kokultur von ATCC 46645 und OE*fccR* mit *S. rapamycinicus* (unabhängig vom Medium) färbte sich der Kulturüberstand gelblich-braun (Abbildung 13). Die Färbung der Kokultur von ATCC 46645 in AMM mit Acetat war schwächer als in AMM mit Glukose als C-Quelle (= AMM). Im Wildtyp begünstigte Acetat als einzige C-Quelle die Bildung der

Fumicycline demnach nicht. Im Überexpressionsstamm hingegen war in AMM mit Acetat der Überstand intensiv gelblich-braun gefärbt (Abbildung 13).

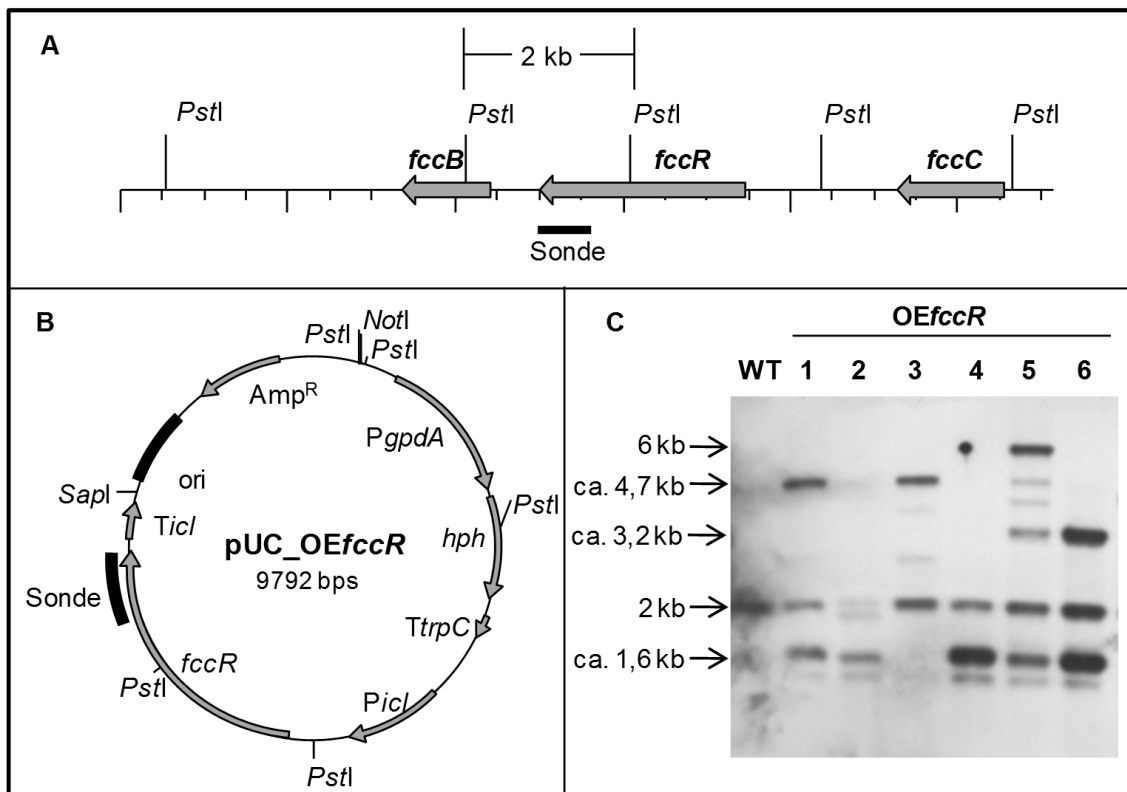


Abbildung 12: Übersicht des *fccR*-Überexpressionsstammes OEfccR

A Schematische Darstellung des Wildtyp-Locus mit Position der verwendeten Sonde. **B** Darstellung des Plasmids pUC_OEfccR, mit *fccR* unter Kontrolle des durch Zugabe von Acetat induzierbaren Promotors der Isocitratlyase (*PicI*) und der verwendeten Hygromycin-Resistenzkassette (*PgpdA*, *hph*, *TtrpC*). **C** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Transformation. Der Einbau des Überexpressionskonstruktes erfolgte ektopisch. Als Restriktionsenzym wurde *PstI* verwendet. Das Wildtyp-Signal liegt bei 2 kb. Die Zahlen 1-6 repräsentieren eine Auswahl der getesteten Transformanten.

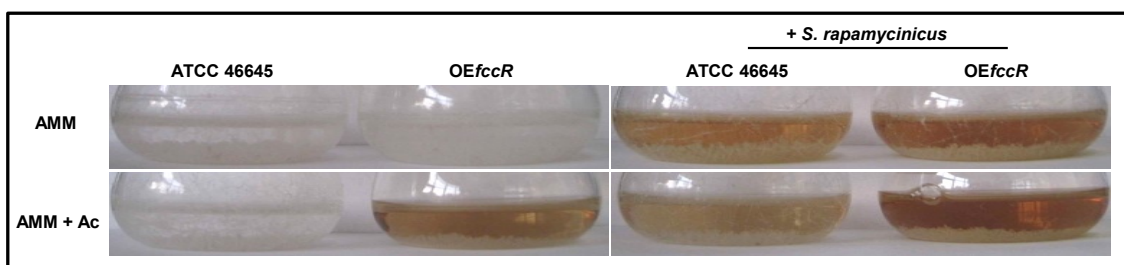


Abbildung 13: Kulturen von Wildtyp und OEfccR in AMM bzw. AMM mit Acetat in Kokultur mit *S. rapamycinicus*

Der *A. fumigatus* Wildtyp (ATCC 46645) bzw. der Überexpressionsstamm des Transkriptionsfaktorgens (OEfccR) wurden mit bzw. ohne *S. rapamycinicus* in AMM mit Glukose (AMM) bzw. Acetat (AMM + Ac) als C-Quelle kultiviert.

Die Ergebnisse der Kokultivierungen wurden auch von den Daten der HPLC-Analysen unterstützt (Abbildung 14). Wurde der Wildtyp mit *S. rapamycinicus* kokultiviert bzw. wenn der *OEfccR*-Stamm unter induzierenden Bedingungen (AMM mit Acetat) mit bzw. ohne Streptomyces kultiviert wurde, konnten Fumicycline im Metabolitprofil nachgewiesen werden (grau hinterlegter Bereich in Abbildung 14). Durch Kokultur konnte die Menge an gebildeten Fumicyclinen im *OEfccR*-Stamm noch zusätzlich gesteigert werden. Dies deutet daraufhin, dass nicht nur die Transkription der *fcc*-Gene für die Fumicyclin-Bildung notwendig ist, sondern auch noch andere, bisher nicht bekannte Prozesse wie z. B. posttranslationale Modifikationen, eine Rolle spielen. Das unterschiedliche Erscheinungsbild der Fumicycline im HPLC-Profil (Anzahl der Peaks) ist auf die Instabilität und Tautomerisierung der Fumicycline zurückzuführen (persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach).

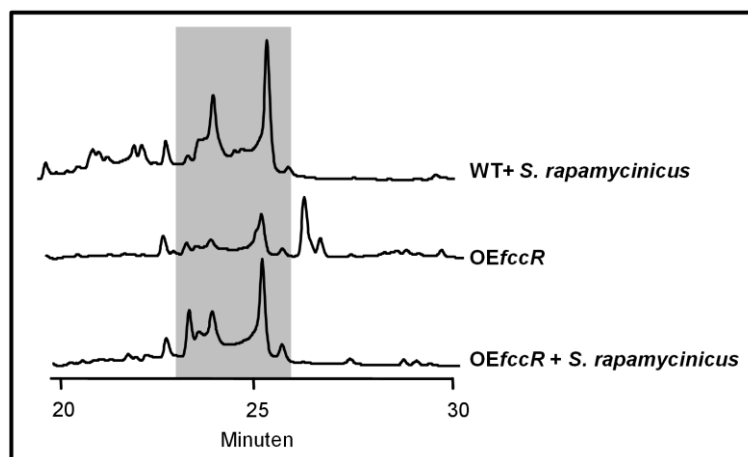


Abbildung 14: Analyse der Fumicyclin-Produktion im WT und im *OEfccR*-Stamm

Der Wildtyp (WT) wurde in AMM, der *fccR*-Überexpressionsstamm (*OEfccR*) wurde unter induzierenden Bedingungen in AMM mit 100 mM Acetat mit bzw. ohne *S. rapamycinicus* für 24 h kultiviert und die gebildeten Metabolite wurden mit HPLC untersucht. Der grau hinterlegte Bereich umfasst die Gruppe der Fumicycline.

Auch wenn bereits gezeigt werden konnte, dass die Bildung der Fumicycline im *OEfccR*-Stamm allein durch Acetat als C-Quelle induziert werden konnte, wurde untersucht, ob unter induzierenden Bedingungen alle *fcc*-Gene transkribiert wurden. Dafür wurde eine „Northern blot“-Analyse durchgeführt (Abbildung 15). In AMM mit Acetat als einziger C-Quelle wurden der *A. fumigatus* Wildtyp und der *OEfccR*-Stamm mit (+) bzw. ohne (-) *S. rapamycinicus* kultiviert und die Menge gebildeten Transkripts nach 3 h bestimmt.

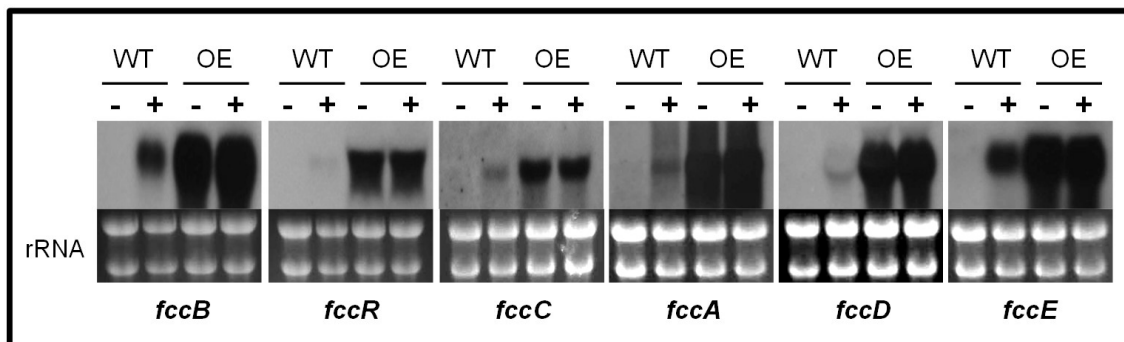


Abbildung 15: Bestimmung der gebildeten *fcc*-Transkriptmengen im Wildtyp und OE*fccR*-Stamm unter induzierenden Bedingungen

Der Wildtyp (WT) und der *fccR*-Überexpressionsstamm (OE) wurden ohne (-) bzw. mit (+) *S. rapamycinicus* in AMM mit 100 mM Acetat als alleiniger C-Quelle kultiviert und die Transkriptmengen der Gene *fccB*, *fccR*, *fccC*, *fccA*, *fccD*, *fccE* wurden nach 3 h untersucht. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Die Ergebnisse des „Northern blots“ unterstützen die bisherigen Ergebnisse. Im Wildtyp wurden die *fcc*-Gene ohne den Streptomyceten nicht transkribiert. Acetat als C-Quelle induzierte somit nicht die Fumicyclin-Biosynthesegene. Auch in der Kokultur des Wildtyps mit *S. rapamycinicus* konnten nur wenige Transkripte im Vergleich zu den Proben des OE*fccR*-Stammes nachgewiesen werden. Dies erklärt auch die geringere Färbung des Kulturüberstandes der Wildtyp-Kokultur in AMM mit Acetat (Abbildung 13). Im OE*fccR*-Stamm hingegen wurden alle *fcc*-Gene transkribiert, wenn im AMM Acetat als C-Quelle enthalten war. Die Intensität der Signale war vergleichbar mit den Transkriptmengen der OE*fccR* – *S. rapamycinicus*-Kokultur. Enthielt das Medium Acetat als einzige C-Quelle war der *icl*-Promotor des Überexpressionskonstruktes aktiv und *fccR* wurde transkribiert. Dass unter diesen Bedingungen auch die anderen *fcc*-Gene transkribiert (Abbildung 15) und zudem Fumicycline produziert wurden (Abbildung 13 und Abbildung 14), beweist, dass der Transkriptionsfaktor FccR ausreichend für die Transkription aller im *fcc*-Cluster lokalisierten Gene und die Fumicyclin-Produktion ist.

1.2.2 Rolle der Clustergene *fccB*, *fccC*, *fccD* und *fccE* bei der Fumicyclin-Produktion

Nachdem der Regulator der *fcc*-Gene und der Fumicyclin-Biosynthese identifiziert werden konnte, war es Ziel, die Funktion der anderen im Cluster lokalisierten Gene für die Fumicyclin-Biosynthese nachzuweisen. Dafür wurden Deletionsstämme der Gene *fccB*, *fccC*, *fccD* und *fccE* generiert. Bei Anreicherung von Zwischenprodukten in den Deletionsstämmen, sollte deren Struktur aufgeklärt werden. Als Rezipientenstamm wurde u. a. der OE*fccR*-Stamm gewählt.

Für *fccC* und *fccD* war eine Deletion in diesem Stamm nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die Deletion dieser Gene der Stamm CEA17 Δ *akuB*^{KU80} verwendet.

Funktion von *fccB* bei der Fumicyclin-Produktion

Durch Analyse der annotierten Genfunktion (Nierman *et al.*, 2005) und der Informationen aus Genom-Datenbanken (AspGD (www.aspergillusgenome.org), CADRE (www.cadre-genomes.org.uk)) konnte der Locus AFUA_7G00120 (*fccB*) als Metallo- β -Lactamase ähnliche Thioesterase identifiziert werden. Eine Domänenanalyse der Protein-Sequenz (mit „NCBI conserved domains“, www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) hatte ergeben, dass FccB, zusammengesetzt aus 330 AS, zur Superfamilie der Metallo- β -Lactamasen gehört und zusätzlich noch eine Hydrolase-Aktivität besitzt. Das Gen *fccB* besteht aus 1041 Nukleotiden und enthält ein Intron.

Die Deletion des *fccB*-Gens wurde im OE*fccR*-Stamm durchgeführt, der Resistenzmarker war Pyrithiamin. Das *fccB*-Deletionskonstrukt wurde mit der 3-Fragment-PCR (auch Fusions-PCR genannt) (Szewczyk *et al.*, 2006) erzeugt. Dafür wurden die Flanken im 3'- und 5'-Bereich des *fccB*-Gens mit den Primerpaaren *fccB*-fwd-up1/*fccB*-rev-up3 und *fccB*-fwd-down4/*fccB*-rev-down6 aus gDNA amplifiziert. Für die Pyrithiamin-Resistenzkassette wurden die Primer PTR-fwd und PTR-rev verwendet, das Plasmid peYFP-c-mut-pyrithiamin diente als Template. Diese drei DNA-Fragmente (Flanken und Resistenzkassette) wurden in einer weiteren PCR mit den Primern *fccB*-fwd-up2 und *fccB*-rev-down5 zum Deletionskonstrukt fusioniert.

Durch Verwendung des Überexpressionstammes OE*fccR* als Rezipientenstamm der *fccB*-Deletion konnte die Expression des *fccR*-Gens und dadurch die der anderen *fcc*-Clustergene durch Acetat im Medium induziert werden. Die Anreicherung und Identifizierung von Zwischenprodukten der Fumicyclin-Biosynthese sollte so begünstigt werden.

Die erfolgreiche Deletion des *fccB*-Gens konnte sowohl durch PCR (Daten nicht gezeigt) als auch durch einen „Southern blot“ nachgewiesen werden (Abbildung 16). Der Deletionsmutante fehlte die Bande bei 6,8 kb. Sie enthielt somit keine Verunreinigungen des Rezipientenstammes. Zudem enthielt der Δ *fccB*-Stamm vermutlich eine ektopische Integration des Deletionskonstruktes (Bande bei ca. 3,5 kb).

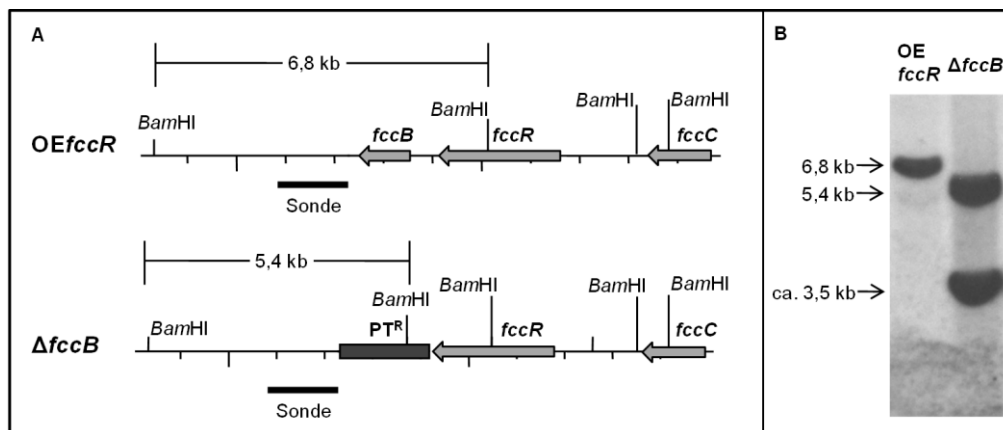


Abbildung 16: Deletion des Thioesterasegens *fccB*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Rezipientenstamm *OEfccR* sowie des *fccB*-Deletionsstammes ($\Delta fccB$). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *Bam*HI und der erwarteten Bandengrößen. Als Marker wurde die Pyrithiaminresistenz-Kassette (PT^R) verwendet. **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des Gens *fccB*. Für den Nachweis wurde der 3'-Bereich von *fccB* als Sonde verwendet.

Um zu testen, ob die Deletion von *fccB* einen Einfluss auf die Transkription der anderen *fcc*-Gene hat, wurde eine „Northern blot“-Analyse durchgeführt. Dafür wurde der Rezipientenstamm und der $\Delta fccB$ -Stamm mit *S. rapamycinicus* in AMM mit Acetat als C-Quelle kultiviert und das mRNA-Level der *fcc*-Gene nach 3 h bestimmt (Abbildung 20). In der Kokultivierung konnte nur für das deletierte Gen *fccB* kein Transkript nachgewiesen werden. Alle anderen Gene des Clusters (*fccR*, *fccC*, *fccA*, *fccD*, *fccE*) wurden weiterhin in gleicher Stärke wie im Stamm *OEfccR* transkribiert (Abbildung 20). Somit ist FccB nicht notwendig für die Transkription der Fumicyclin-Biosynthesegene. Die Anreicherung von Zwischenprodukten im *fccB*-Stamm wurde mit HPLC in Kooperation mit Dr. K. Scherlach (HKI, Jena) überprüft (Abbildung 21). Die Fumicyclin-typische Gelbfärbung des Kulturüberstandes nach 24 h Kokultur war nicht erkennbar (Abbildung 21). Im Extrakt der Kokultur konnten dennoch geringe Mengen Fumicycline durch HPLC (Abbildung 21) und Massenspektrometrie (MS, persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach) nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung, dass es sich bei FccB um eine Thioesterase handelt. Durch das Fehlen von FccB wird das Polyketid nicht von der PKS FccA abgetrennt und kann somit nicht sekretiert werden. Deshalb färbt sich der Kulturüberstand nicht gelb. Die geringen Mengen Fumicycline, die dennoch nachweisbar waren, sind dadurch zu erklären, dass für die Bestimmung des Metabolitprofils die Gesamtheit der Kultur (Medium und Myzel) verarbeitet wurde. Somit wurden die Fumicycline detektiert, die bereits von den FccA-Molekülen in den

Pilzhyphe gebildet wurden, aber durch die fehlende Aktivität von FccB nicht ins Medium sekretiert werden konnten.

Deletion des Gens *fccC*

Mit Hilfe der Daten der Genomdatenbanken CADRE (www.cadre-genomes.org.uk) und AspGD (www.aspergillusgenome.org) konnte *fccC* (AFUA_7G00150) als Gen für eine Monooxygenase identifiziert werden. Die Domänenanalyse der 408 AS der Protein-Sequenz mit „NCBI conserved domains“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) ergab, dass das Enzym eine FAD-Bindedomäne und eine Salicylat-Monooxygenase-Domäne enthält. Enzyme mit dieser Domäne konvertieren Salicylat zu Catechol, einem Intermediat des Aromaten-Abbaus. Das Gen *fccC* besteht aus 1280 nt und enthält ein Intron.

Die Deletion des *fccC*-Gens wurde im Stamm CEA17 Δ *akuB*^{KU80} durchgeführt (Abbildung 17).

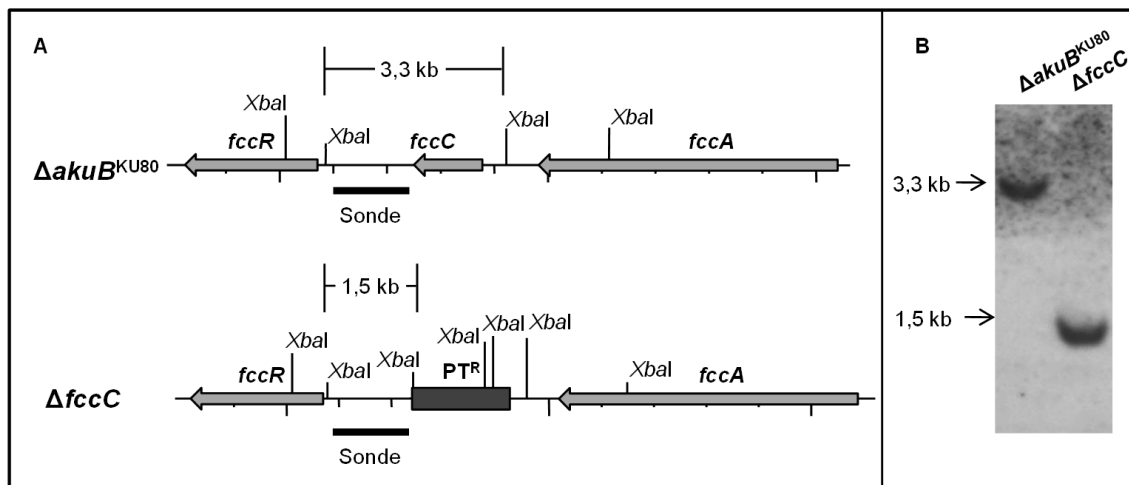


Abbildung 17: Deletion des Monooxygenasegens *fccC*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Rezipientenstamm CEA17 Δ *akuB*^{KU80} (Δ *akuB*^{KU80}) sowie im *fccC*-Deletionsstamm (Δ *fccC*). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *Xba*I und die erwarteten Bandengrößen. Als Marker wurde die Pyrimidinresistenz-Kassette (PTR) verwendet. **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des Monooxygenasegens (Δ *fccC*). Für den Nachweis wurde die 3'-Flanke des *fccC*-Gens als Sonde verwendet.

Für die Generierung des Deletionskonstruktes wurde die 3-Fragment-PCR verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Dafür wurden die Bereiche im 3'- und 5'-Bereich (Flanken) mit den Primerpaaren *fccC*-fwd-up1/*fccC*-rev-up3 und *fccC*-fwd-down4/*fccC*-rev-down6 und die Pyrimidin-Resistenzkassette mit PTR_fwd und PTR_rev aus gDNA bzw. dem Plasmid peYFP-c-mut-pyrimidin amplifiziert. Diese drei DNA-Fragmente wurden in einer weiteren PCR mit

den Primern *fccC*-fwd-up2 und *fccC*-rev-down5 zum Deletionskonstrukt fusioniert. Der Erfolg der Deletion des *fccC*-Gens wurde mit PCR (Daten nicht gezeigt) und „Southern blot“ überprüft (Abbildung 17).

Der Einfluss der *fccC*-Deletion auf die Transkription der anderen *fcc*-Gene wurde mit „Northern blot“ überprüft. Dafür wurden CEA17 Δ *akuB*^{KU80} und der Δ *fccC*-Stamm in AMM mit *S. rapamycinicus* kokultiviert und die Menge gebildeten Transkripts wurde nach 3 h bestimmt (Abbildung 20). Wie erwartet, waren im Δ *fccC*-Stamm in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* für das deletierte Gen keine Transkripte nachweisbar. Die Transkription aller anderen *fcc*-Gene war in der Kokultur in einem mit dem Rezipientenstamm vergleichbaren Maße induziert (Abbildung 20). Auch das Metabolit-Profil des Δ *fccC*-Stammes der Kokultur wurde analysiert, um mögliche Zwischenprodukte der Fumicyclin-Biosynthese zu identifizieren. Der Überstand der Kokultur war gelb gefärbt, es waren jedoch keine Fumicycline durch HPLC (Abbildung 21) oder MS (persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach) nachweisbar. Die Färbung des Kulturüberstandes wurde daher entweder nicht durch Fumicycline hervorgerufen, oder die Derivate im Δ *fccC*-Stamm waren während der Aufreinigung, z. B. durch veränderte chemische Eigenschaften oder Degradation, verloren gegangen.

Deletion des Gens *fccD*

Genomdatenbanken wie CADRE (www.cadre-genomes.org.uk), *Aspergillus* Comparative (www.broadinstitute.org) und AspGD (www.aspergillusgenome.org) zeichnen *fccD* als Gen für eine Dimethylallyltryptophansynthase (DMAT, aromatische Prenyltransferase) aus. Die Analyse der 453 AS der Protein-Sequenz von FccD mit „NCBI conserved domains“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) bestätigte diese Einordnung. Das Gen *fccD* ist 1362 nt lang und enthält keine Intronen.

Für die Herstellung des *fccD*-Deletionskonstruktes wurde die 3-Fragment-PCR verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Dafür wurden die flankierenden Bereiche des Gens *fccD* mit den Primerpaaren *fccD*-fwd-up1/*fccD*-rev-up3 und *fccD*-fwd-down4/*fccD*-rev-down6 amplifiziert. Als Resistenzmarker wurde Pyrithiamin verwendet. Die Resistenzkassette wurde mit den Primern PTR_fwd und PTR_rev hergestellt. Dafür wurde das Plasmid peYFP-c-mut-pyrithiamin verwendet. Die entstandenen drei DNA-Fragmente wurden in einer weiteren PCR und den Primern *fccD*-fwd-up2 und *fccD*-rev-down5 zum *fccD*-Deletionskonstrukt fusioniert. Als Rezipientenstamm der *fccD*-Deletion wurde CEA17 Δ *akuB*^{KU80} verwendet (Abbildung 18).

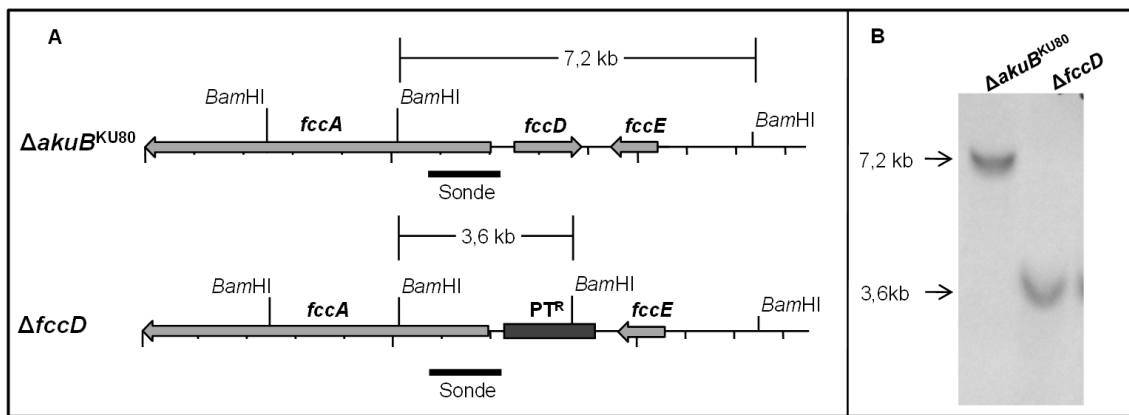


Abbildung 18: Deletion des Dimethylallyltryptophansynthase (DMAT)-Gens *fccD*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Rezipientenstamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$) sowie des *fccD*-Deletionsstammes ($\Delta fccD$). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *Bam*HI und die erwarteten Bandengrößen. Als Marker wurde die Pyrithiaminresistenz-Kassette (PT^R) verwendet. **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des Gens *fccD*. Für den Nachweis wurde die 5'-Flanke von *fccD* als Sonde verwendet.

Für die Identifizierung von Zwischenprodukten der Fumicyclin-Biosynthese im $\Delta fccD$ -Stamm wurde ein Kokultivierungsexperiment mit *S. rapamycinicus* durchgeführt. Als Kontrolle wurde CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ebenfalls mit dem Streptomyceten kokultiviert (Abbildung 21). Die gebildeten Metabolite wurden nach 24 h Kultivierung mit HPLC analysiert. Der Überstand des $\Delta fccD$ -Stammes zeigte die Fumicyclin-typische Färbung. Jedoch waren keine Fumicycline durch HPLC (Abbildung 21) oder MS (persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach, HKI Jena) nachweisbar. Deshalb wurde zusätzlich eine „Northern blot“-Analyse der *fcc*-Gene im $\Delta fccD$ -Stamm im Vergleich zum Rezipientenstamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ durchgeführt. Die gebildete mRNA wurde nach 3 h Kokultur des $\Delta fccD$ -Stammes mit *S. rapamycinicus* bestimmt (Abbildung 20). Die Deletion von *fccD* hatte keinen Einfluss auf die Transkription der anderen im Cluster lokalisierten *fcc*-Gene. *fccB*, *fccR*, *fccC*, *fccA* und *fccE* bildeten eine mit dem Rezipientenstamm vergleichbare Transkriptmenge (Abbildung 20). Da mit der PKS FccA das Schlüsselenzym der Fumicyclin-Biosynthese (und außer dem deletierten Gen auch alle anderen Gene des Clusters) transkribiert wurde, ist davon auszugehen, dass die gelbliche Färbung des Kulturüberstandes auf die Produktion von Fumicyclinen zurückzuführen ist. Der fehlende Nachweis der Fumicyclin-Produktion mit HPLC kann möglicherweise auf veränderte chemische Eigenschaften der Fumicycline zurückgeführt werden, da die hydrophobe Prenyl-Kette im $\Delta fccD$ -Stamm fehlt.

Deletion des Gens *fccE*

fccE ist ein Gen, das für eine NAD-abhängige Epimerase/Dehydratase kodiert (CADRE (www.cadre-genomes.org.uk), AspGD (www.aspergillusgenome.org)) und aus 948 nt besteht und keine Intronen enthält. Eine Analyse der Domänen-Struktur der 315 AS der Protein-Sequenz mit „NCBI conserved domains“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) ergab, dass FccE eine Rossmann-Faltung besitzt. Die Rossmann-Faltung ist typisch für Dehydrogenasen und Redoxenzyme und ist eine NAD-Bindestelle (Rossmann *et al.*, 1974; Muramatsu *et al.*, 2005). Des Weiteren ist auch eine Domäne der Superfamilie Epimerase/Dehydratase kodiert. Für die Deletion von *fccE* wurde die Methode der 3-Fragment-PCR verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Die Flanken von *fccE* wurden mit den Primern *fccE*-fwd-up1 und *fccE*-rev-up3 bzw. *fccE*-fwd-down4 und *fccE*-rev-down6 aus gDNA amplifiziert. Die Herstellung der Pyrithiamin-Resistenzkassette erfolgte mit den Primern PTR_fwd und PTR_rev aus dem Plasmid peYFP-c-mut-pyrithiamin. Die entstandenen DNA-Fragmente wurden mit dem Primerpaar *fccE*-fwd-up2/*fccE*-rev-down5 zum *fccE*-Deletionskonstrukt vereint. Als Ausgangsstamm für die Deletion des *fccE*-Gens wurde der OE*fccR*-Stamm verwendet (Abbildung 19).

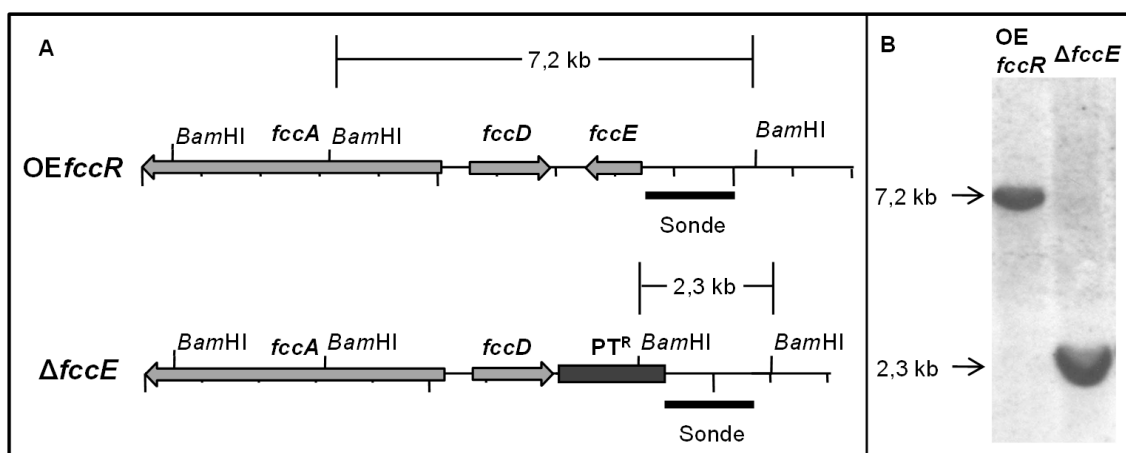


Abbildung 19: Deletion des Epimerasegens *fccE*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Überexpressionsstamm (OE*fccR*) und im Epimerase-Deletionsstamm (Δ *fccE*). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *Bam*HI und die erwarteten Bandengrößen. Als Marker wurde die Pyrithiaminresistenz-Kassette (PTR^R) verwendet. **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des Epimerasegens. Für den Nachweis wurde die 5'-Flanke als Sonde verwendet.

Der Einfluss der *fccE*-Deletion auf die Transkription der anderen *fcc*-Gene wurde mit „Northern blot“ (Abbildung 20) und die Anreicherung von Zwischenprodukten der Fumicyclin-Biosynthese mit HPLC (Abbildung 21) untersucht. Dafür wurden beide Stämme in AMM mit

Acetat als C-Quelle zusammen mit *S. rapamycinicus* kultiviert. Das mRNA-Level wurde nach 3 h, die gebildeten Metabolite wurden nach 24 h bestimmt. Im $\Delta fccE$ -Stamm wurden alle anderen *fcc*-Gene in ähnlichem Maße wie im OE*fccR*-Stamm transkribiert (Abbildung 20). Der Kulturüberstand zeigte zum einen eine gelbliche Färbung und auch durch HPLC konnte die Produktion von Fumicyclinen nachgewiesen werden. Bei einer Retentionszeit von ca. 25,5 min kommt es zur Anreicherung eines Fumicyclin-Derivates (Abbildung 21). Es wurden dennoch eine Reihe weiterer Fumicycline gebildet. Die Aufreinigung eines Zwischenproduktes der Fumicyclin-Biosynthese im $\Delta fccE$ -Stamm war nicht möglich (persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach). Die Anreicherung eines Hauptpeaks im HPLC-Profil deutet daraufhin, dass im $\Delta fccE$ -Stamm die Umwandlung eines Derivates der Fumicyclin-Biosynthese in ein anderes nicht mehr stattfinden kann. Dennoch wurden immer noch mehrere andere Derivate gebildet bzw. entstanden durch Degradation auf Grund natürlicher Instabilität der Fumicycline oder durch Tautomerisierung.

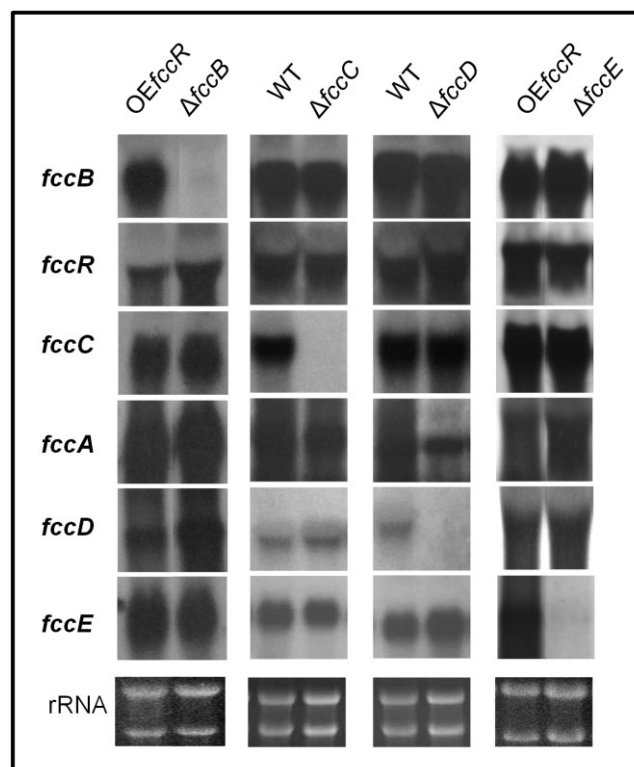


Abbildung 20: "Northern blot"-Analysen der $\Delta fccB$ -, $\Delta fccC$ -, $\Delta fccD$ - und $\Delta fccE$ -Stämme in der Kokultur mit *S. rapamycinicus*

Die Deletionsstämme der Fumicyclin-Biosynthesegene $\Delta fccB$, $\Delta fccC$, $\Delta fccD$ und $\Delta fccE$ wurden mit *S. rapamycinicus* kultiviert. Die Probenahme erfolgte nach 3 h Kokultivierung. Den Kulturen von $\Delta fccB$ und $\Delta fccE$ wurden 100 mM Acetat anstatt Glukose als C-Quelle zugesetzt. Die 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

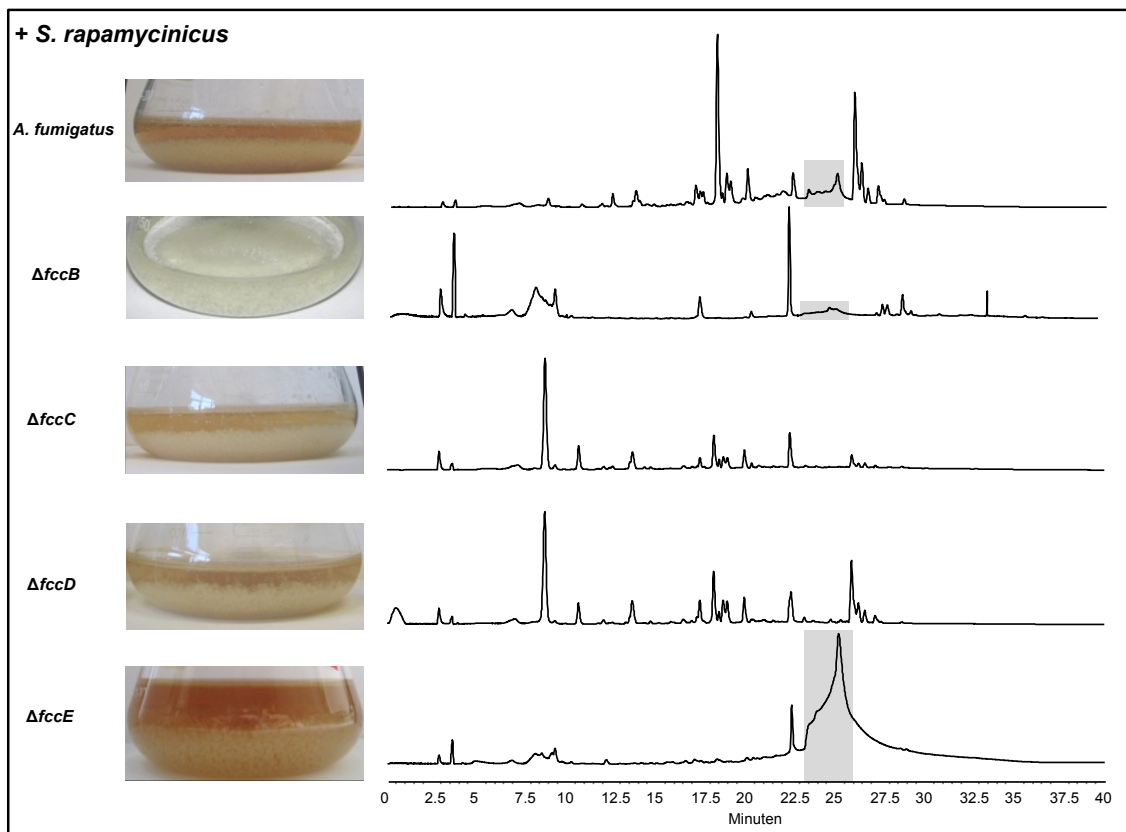


Abbildung 21: Fumicyclin-Produktion in den Deletionsstämmen $\Delta fccB$, $\Delta fccC$, $\Delta fccD$ und $\Delta fccE$

Kulturen und HPLC-Profile von *A. fumigatus* und den Stämmen $\Delta fccB$, $\Delta fccC$, $\Delta fccD$ und $\Delta fccE$ nach 24 h Kokultur mit *S. rapamycinicus*. Die Kulturen mit $\Delta fccB$ und $\Delta fccE$ enthielten Acetat als alleinige C-Quelle in der Hauptkultur. Der grau hinterlegte Bereich kennzeichnet Metabolite, die zur Gruppe der Fumicycline gehören.

Eine vollständige Aufklärung der Fumicyclin-Biosynthese war nicht möglich, da zum einen in den Deletionsstämmen von *fccR*, *fccC* und *fccD* keine Fumicycline nachweisbar waren und zum anderen auch in den Stämmen $\Delta fccB$ und $\Delta fccE$ die Aufreinigung von Zwischenprodukten der Fumicyclin-Biosynthese nicht möglich war. Die Funktion der PKS *FccA* als Produzent des Polyketid-Grundgerüsts konnte ich bereits während meiner Diplomarbeit zeigen (König, 2009). Im Rahmen dieser Dissertation konnte ich nun auch zeigen, dass *FccR* der Transkriptionsfaktor der *fcc*-Gene und Regulator der Fumicyclin-Biosynthese ist.

2 Wirkung von *S. rapamycinicus* auf das Sekundärmetabolit-Profil anderer *Aspergillus*-Arten

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *S. rapamycinicus* auch in *A. nidulans* ein Sekundärmetabolit-Gencluster, das *ors*-Cluster, aktiviert (Schroeckh *et al.*, 2009). Ohne Streptomyceten fand keine Transkription der *ors*-Gene und keine Bildung der

Sekundärmetabolite Lecanorsäure und Orsellinsäure, sowie der Substanzen F9775A und F9775B statt. Das bedeutet, *S. rapamycinicus* kann stille Gencluster sowohl in *A. fumigatus* als auch in *A. nidulans* aktivieren. Deshalb wurde getestet, ob der Streptomyces auch die Bildung von Sekundärmetaboliten in der zu *A. fumigatus* taxonomisch nahe verwandten Art *Neosartorya fischeri* induzieren kann.

Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde der gleiche Versuchsaufbau wie für die *A. fumigatus* – *S. rapamycinicus* Koinkubation gewählt. Dafür wurden Sporen beider Pilze zunächst in AMM vorkultiviert, das Myzel nach 16 h in frisches AMM überführt und die Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* begonnen. Nach 24 h wurden die gebildeten Metabolite in Kooperation mit Dr. K. Scherlach (HKI, Jena) untersucht (Abbildung 22).

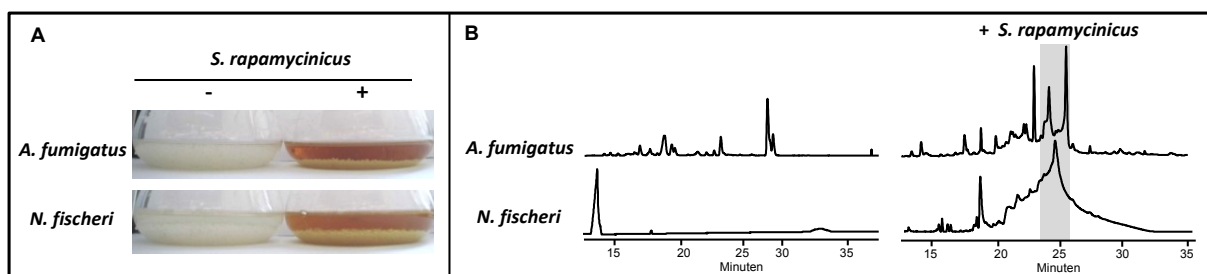


Abbildung 22: Kokultivierung von *N. fischeri* mit *S. rapamycinicus*

A Vergleich der Kokultivierungen von *S. rapamycinicus* mit *A. fumigatus* und *N. fischeri* nach 24 h. **B** HPLC-Profile der Einzelkulturen von *A. fumigatus* und *N. fischeri* und Kokultivierungen mit *S. rapamycinicus*. Der grau hinterlegte Bereich entspricht den Fumicyclinen (*A. fumigatus*) bzw. Substanzen ähnlich den Fumicyclinen (*N. fischeri*).

Kultiviert in Flüssig-AMM unterschieden sich beide Arten nicht in Wachstum und Färbung des Kulturüberstandes während der Kokultivierung mit *S. rapamycinicus*. Die Kulturüberstände waren in beiden Monokulturen farblos, das Myzel weiß. In den Kokulturen wiesen die Überstände einen sehr ähnlichen Gelbton auf (Abbildung 22A). Die Metabolitprofile der Monokulturen unterschieden sich. Ausgehend von der Anzahl der Peaks in den HPLC-Spektren konnten in *A. fumigatus* mehr Metabolite nachgewiesen werden als in *N. fischeri*. Die HPLC-Spektren der Kokulturen unterschieden sich deutlich von den Monokulturen (Abbildung 22B). In den Kokulturen beider Stämme wurden mehr Metabolite nachgewiesen als in den Einzelkulturen. In der Kokultur von *N. fischeri* mit *S. rapamycinicus* konnte eine Reihe von Substanzen identifiziert werden (grau hinterlegter Bereich in Abbildung 22B), die gleiche Retentionszeiten und ähnliche UV-Spektren und Massen (MS-Analyse) wie die Fumicycline besitzen (persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach). Bei diesen Substanzen handelt es sich

wahrscheinlich um Neosartoricine (Chooi *et al.*, 2013). Bisher konnte die Bildung dieser Metabolite in *N. fischeri* nur durch Überexpression des im Neosartoricin-Cluster lokalisierten Transkriptionsfaktors induziert werden (Chooi *et al.*, 2013). Mit den durchgeführten Experimenten konnte nun jedoch gezeigt werden, dass Neosartoricine auch während der Kokultivierung von *N. fischeri* und *S. rapamycinicus* gebildet werden.

S. rapamycinicus besitzt somit Induktoren, die die Metabolitprofile von *Aspergilli* der Sektionen *Nidulantes* (*A. nidulans*) und *Fumigati* (*A. fumigatus*, *N. fischeri*) beeinflussen können. *S. rapamycinicus* könnte daher ein Werkzeug zur Aktivierung stiller Sekundärmetabolit-Gencluster im Genus *Aspergillus* sein. Um dies zu testen, wurden weitere Kokultivierungsexperimente durchgeführt. Dafür wurden *Aspergilli* der Sektionen *Flavi* (*A. oryzae*), *Versicolores* (*A. versicolor*) und *Clavati* (*A. clavatus*) ausgewählt, die zahlreiche Sekundärmetabolite bilden können (Abe *et al.*, 2006; Machida *et al.*, 2008; Miao *et al.*, 2012; Zutz *et al.*, 2013). Die Metabolit-Produktion der Einzel- und Kokultivierungen wurde mittels HPLC analysiert (Abbildung 23).

Die Metabolitprofile der Kokulturen von *A. versicolor*, *A. oryzae* und *A. clavatus* mit *S. rapamycinicus* unterschieden sich nicht bzw. kaum von den Einzelkulturen. In den ausgewählten Vertretern der *Aspergillus* Sektionen *Flavi* (*A. oryzae*), *Clavati* (*A. clavatus*) und *Versicolores* (*A. versicolor*) konnte durch *S. rapamycinicus* nicht die Bildung neuer Metabolite induziert werden. Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei *S. rapamycinicus* nicht um ein generelles Hilfsmittel zur Aktivierung stiller Gencluster für *Aspergillus*-Spezies handelt. Es ist jedoch durchaus möglich, dass auch in noch nicht getesteten *Aspergillus*-Spezies stille Sekundärmetabolit-Gencluster angeschaltet werden können. Die Aktivierung stiller Gencluster in *A. fumigatus*, *N. fischeri* und *A. nidulans* jedoch nicht in *A. oryzae*, *A. clavatus* und *A. versicolor* lässt einen ähnlichen Aktivierungsmechanismus der Gencluster in diesen Arten vermuten. Im Folgenden wird daher auf die Aktivierung des *fcc*-Clusters (*A. fumigatus*) und *ors*-Clusters (*A. nidulans*) mit Schwerpunkt auf die Regulation der Interaktion von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* eingegangen.

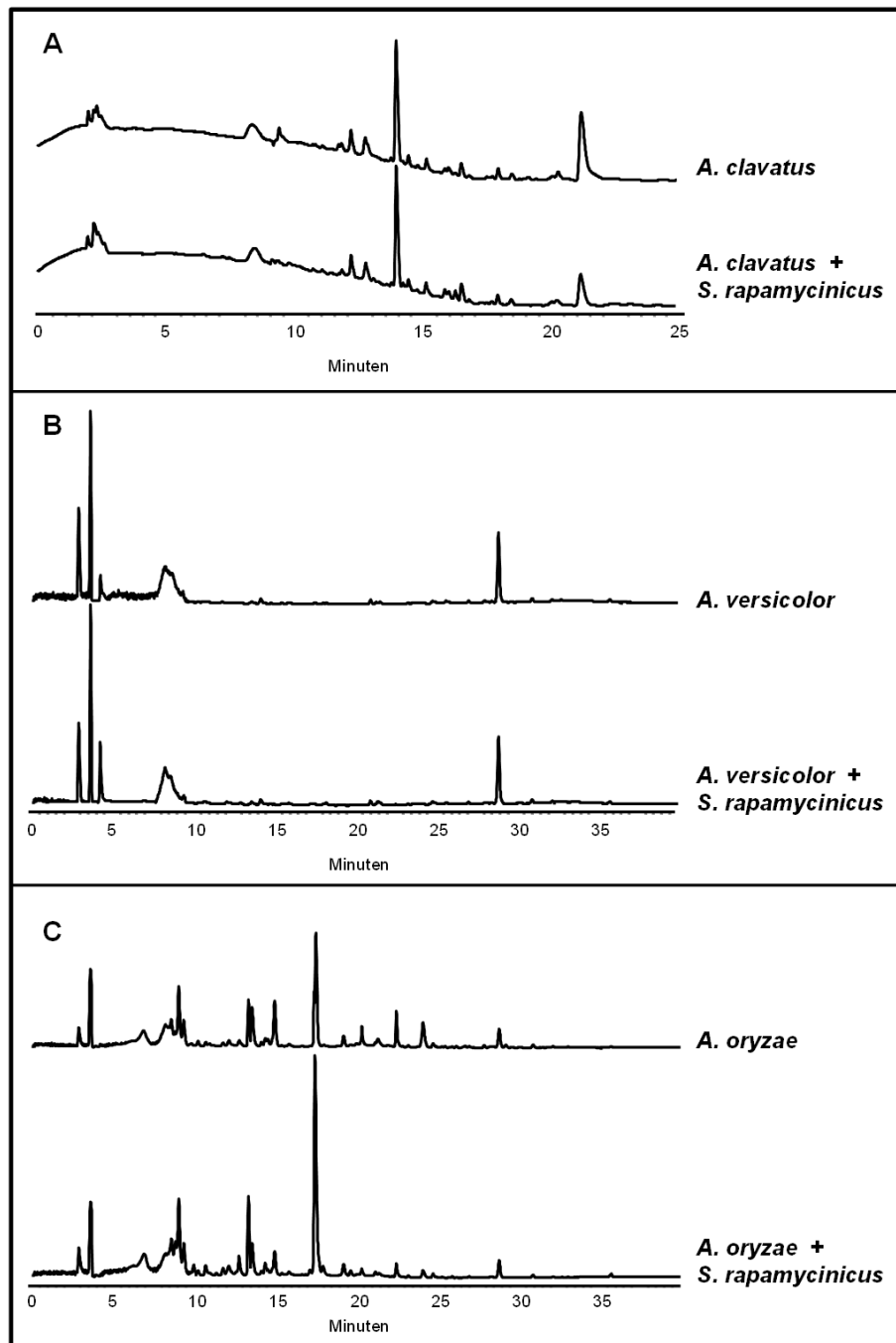


Abbildung 23: HPLC-Profilе verschiedener Aspergilli kokultiviert mit *S. rapamycinicus*

Die HPLC-Profilе der Einzel- bzw. Koinkubationen mit *S. rapamycinicus* nach 24 h sind gezeigt für **A** *A. clavatus* **B** *A. versicolor* und **C** *A. oryzae*.

3 Regulation der *fcc*-Cluster-Aktivierung in *A. fumigatus*

A. fumigatus produziert bei direktem Kontakt mit *S. rapamycinicus* Fumicycline. Es ist nicht bekannt, wie es nach der Kontaktaufnahme beider Organismen zur Signalweiterleitung innerhalb der Pilzhyphe kommt. Neben *A. fumigatus* aktiviert *S. rapamycinicus* auch ein Sekundärmetabolit-Gencluster in *A. nidulans* (Schroeckh *et al.*, 2009). Unbekannt ist, ob in

beiden *Aspergilli* die gleichen Signalwege involviert sind. Durch Aufklärung der Signaltransduktion kann möglicherweise geklärt werden, warum *S. rapamycinicus* Sekundärmetabolite in diesen beiden *Aspergilli* induziert, nicht aber in anderen Spezies wie *A. oryzae*, *A. clavatus* und *A. versicolor*.

3.1 Einfluss von Histon-Modifizierungen auf die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters

In Eukaryoten ist die Acetylierung von Histon-Proteinen ein reversibler Prozess, der die Auflockerung der Chromatin-Struktur ermöglicht und dadurch die Regulation der Transkription erleichtert (Waterborg, 2011). Chemische Substanzen zur Modifikation des Chromatins wurden schon mehrfach erfolgreich verwendet, um die Transkription von Sekundärmetabolit-Genclustern zu induzieren (Shwab *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008; Nützmann *et al.*, 2011). Anacardsäure ist ein Histonacetyltransferase-Inhibitor (HAT-Inhibitor) und bewirkt, dass Lysin-Reste von Histon-Proteinen nicht mehr acetyliert werden können (Balasubramanyam *et al.*, 2003; Sun *et al.*, 2006; Sung *et al.*, 2008). Eine entgegengesetzte Wirkung hat der Histondeacetyltransferase-Inhibitor (HDAC-Inhibitor) Suberoylanilid-hydroxam-Säure (SAHA) (Kim *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2010). Wenn HDACs durch SAHA blockiert werden, findet die Deacetylierung von Histonproteinen nicht mehr statt. Anacardsäure und SAHA wurden verwendet, um die Rolle der Chromatin-Struktur auf die Aktivität des Fumicyclin-Clusters zu überprüfen.

Anacardsäure wurde zur Kokultur von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* gegeben, um zu testen, ob die Transkription von *fccA* durch Inhibition der Acetylierung von Histonproteinen unterdrückt werden kann. Dafür wurde erst nach einer einstündigen Einwirkzeit von Anacardsäure *S. rapamycinicus* zur *A. fumigatus*-Kultur gegeben. Es wurde in Vertretung der *fcc*-Gene das mRNA-Level von *fccA* bestimmt, da es für die PKS FccA kodiert und diese den initialen Schritt der Fumicyclin-Biosynthese, die Bildung des Polyketidgrundgerüsts, katalysiert und das Schlüsselenzym der Synthese darstellt. In einem weiteren Experiment wurde getestet, ob durch Hemmung der HDACs mit SAHA die Transkription der *fcc*-Gene induziert werden kann, auch ohne Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* (Abbildung 24 und Abbildung 36). Die mRNA-Mengen wurden 3 h nach Beginn der Kokultur (Experiment mit Anacardsäure) bzw. Zugabe von SAHA bestimmt.

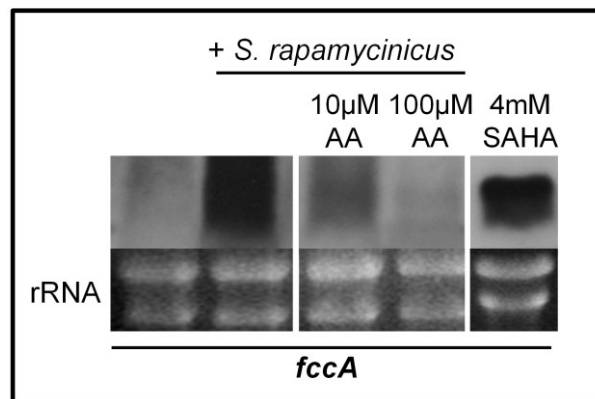


Abbildung 24: Einfluss von HAT- und HDAC-Inhibitoren auf die *fccA*-Transkription

A. fumigatus wurde mit 10 µM bzw. 100 µM Anacardsäure (AA) für 1 h vorbehandelt. Danach wurde *S. rapamycinicus* zugesetzt. In einem weiteren Experiment wurde SAHA zur *A. fumigatus*-Kultur gegeben, jedoch kein *S. rapamycinicus*. Die Transkription des PKS-Gens *fccA* wurde 3 h nach Zugabe des Streptomyceten bzw. von SAHA bestimmt. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Eine Anacardsäure-Konzentration von 10 µM war nicht ausreichend, um die Transkription von *fccA* innerhalb von einer Stunde vollständig zu unterdrücken (Abbildung 24). Bei einer Konzentration von 100 µM wurde *fccA* jedoch nicht mehr transkribiert. Eine Konzentration von 10 µM war demnach zu gering, um eine vollständige Inhibition der HATs zu erreichen und/oder die einstündige Einwirkzeit des HAT-Inhibitors vor Streptomyceten-Zugabe war nicht ausreichend. Die 10-fache Menge des Inhibitors (100 µM Anacardsäure) war jedoch hinreichend, innerhalb einer Stunde die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* zu unterdrücken. Der HDAC-Inhibitor SAHA induzierte die Transkription der *fcc*-Gene auch ohne *S. rapamycinicus* (Abbildung 24 und Abbildung 36). Die Zugabe von SAHA induzierte jedoch nicht die Gelbfärbung des Kulturüberstandes oder die Fumicyclin-Produktion (Daten nicht gezeigt). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass ohne Zugabe von *S. rapamycinicus* die Histon-Proteine im Bereich des Fumicyclin-Clusters in einem deacetylierten Zustand vorliegen und der Streptomycet die Acetylierung begünstigt. Sie zeigen jedoch auch, dass die Transkription der *fcc*-Gene nicht ausreichend für die Bildung der Fumicycline ist und noch weitere regulatorische Prozesse stattfinden, die bisher nicht bekannt sind.

3.2 Deletion des Histonacetyltransferasegens *GcnE*

Für die Aktivierung des *ors*-Clusters in *A. nidulans* in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* ist die HAT *GcnE* essentiell (Nützmann *et al.*, 2011). Im *gcnE*-Deletionsstamm fand keine Aktivierung der Gene *orsA-D* statt und Orsellinsäure und Lecanorsäure wurden nicht mehr gebildet. Das

orthologe Enzym in *A. fumigatus* könnte ebenfalls erforderlich für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters sein.

Die Aminosäure-Sequenz von GcnE wurde für eine Suche mit dem Programm BLAST (Altschul *et al.*, 1990) verwendet. Die Analyse der Daten ergab, dass GcnE zu 93 % identisch mit einer Histonacetyltransferase in *A. fumigatus* ist. Das Protein besteht aus 381 AS, das korrespondierende Gen AFUA_4G12650 aus 1405 nt. Es enthält 4 Intronen. Die Analyse mit „NCBI conserved domains“ (www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure) ergab, dass das Protein zur Superfamilie der N-Acetyltransferasen gehört und zudem eine Bromodomäne (Gcn5-like subfamily) enthält. Nach Pfam-Klassifizierung sind Bromodomänen typisch für Chromatin assoziierte Proteine und interagieren spezifisch mit acetylierten Lysinen. Das Gen AFUA_4G12650 sowie das kodierte Protein wurden *gcnE* bzw. GcnE genannt.

Um zu testen, ob GcnE auch eine essentielle Rolle bei der Aktivierung des Fumicyclin-Clusters spielt, wurde das korrespondierende Gen *gcnE* (AFUA_4G12650) in CEA17 Δ *akuB*^{KU80} deletiert (Abbildung 25).

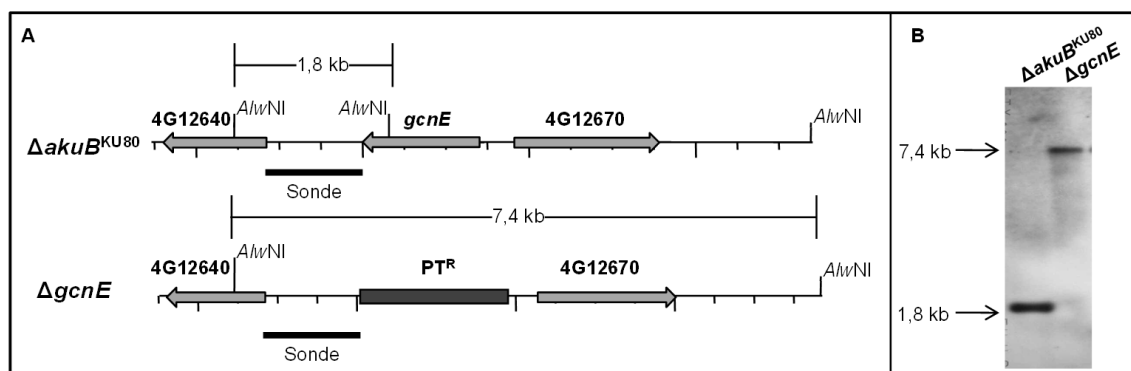


Abbildung 25: Deletion von *gcnE*

A Schematische Darstellung der genomischen Situation im Wildtyp (WT) sowie im *gcnE*-Deletionsstamm (Δ *gcnE*). Eingetragen sind die Schnittstellen des im „Southern blot“ verwendeten Restriktionsenzym *AflwNI* und die erwarteten Bandengrößen. Den Selektionsmarker bildete die Pyrithiaminresistenz-Kassette (PTR). **B** „Southern blot“ zum Nachweis der erfolgreichen Deletion des HAT-Gens (Δ *gcnE*). Für den Nachweis wurde die 3'-Flanke als Sonde verwendet.

Für die Herstellung des Deletionskonstruktes wurde die 3-Fragment PCR verwendet (Szewczyk *et al.*, 2006). Die Primerpaare *gcnE*-fwd-up1/*gcnE*-rev-up3 und *gcnE*-fwd-down4/*gcnE*-rev-down6 wurden genutzt, um die Flanken im 3'- und 5'-Bereich von *gcnE* zu amplifizieren. Die Pyrithiaminresistenz-Kassette wurde mit den Primern PTR_fwd und PTR_rev hergestellt. Die Fusion der entstandenen DNA-Fragmente zum *gcnE*-Deletionskonstrukt erfolgte mit den

Primern *gcnE*-fwd-up2 und *gcnE*-rev-down5. Genomische DNA von *A. fumigatus* diente als Vorlage für die PCR der Flanken und das Plasmid peYFP-c-mut-pyriithiamin für die Resistenzkassette. Eine Komplementation des $\Delta gcnE$ -Stammes war nicht erfolgreich (Daten nicht gezeigt).

3.3 Phänotypische Charakterisierung des $\Delta gcnE$ -Stammes

Der Einfluss der *gcnE*-Deletion auf das Wachstum und die Metabolitbildung wurde untersucht. Wenn der $\Delta gcnE$ -Stamm auf AMM-Agar kultiviert wurde, war die Kolonie weiß. Grau-grün pigmentierte Sporen wie bei CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ waren nicht erkennbar (Abbildung 26A). In weiteren Experimenten wurde der $\Delta gcnE$ -Stamm mikroskopisch untersucht. Dafür wurden Sporen sowohl vom Wildtyp als auch vom $\Delta gcnE$ -Stamm auf AMM-Agar ausplattiert und für 5 Tage bei 37 °C kultiviert. In diesem Zeitraum produzierte CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ zahlreiche grüne Sporen (Abbildung 26A und B). Beim $\Delta gcnE$ -Stamm war mit bloßem Auge nur weißes Myzel erkennbar. Die Untersuchung des Myzels mit einem Binokular ergab, dass der $\Delta gcnE$ -Stamm unpigmentierte Sporen bildete, diese aber in viel geringeren Mengen als der Rezipientenstamm (< 10 %, Abbildung 26B und D). Für eine genauere Untersuchung der Konidiophorenmorphologie wurden sterilisierte Deckgläschen in verschiedenen Winkeln im AMM-Agar platziert. Zuvor wurden Sporen von CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ bzw. dem $\Delta gcnE$ -Stamm ausplattiert. Während des Wachstums bei 37 °C wuchs das Myzel teilweise an den Deckgläschen empor. Diese wurden nach einigen Tagen aus dem Agar entfernt, auf einen Objektträger gelegt und das anhaftende Myzel wurde mikroskopisch betrachtet (Abbildung 26C und D). Die Proben beider Stämme enthielten sowohl Hyphen als auch Konidiophoren (Abbildung 26C). In den Proben von CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ befanden sich weit mehr Sporenträger als im *gcnE*-Deletionsstamm. Bei 400-facher Vergrößerung war zudem erkennbar, dass die Entwicklung der Konidiophore in $\Delta gcnE$ im Vergleich zum Rezipientenstamm verzögert bzw. unvollendet und die Trennung der Sporen beeinträchtigt war (Abbildung 26D). GcnE scheint somit eine Rolle bei der Entwicklung und Reifung der Sporen zu spielen.

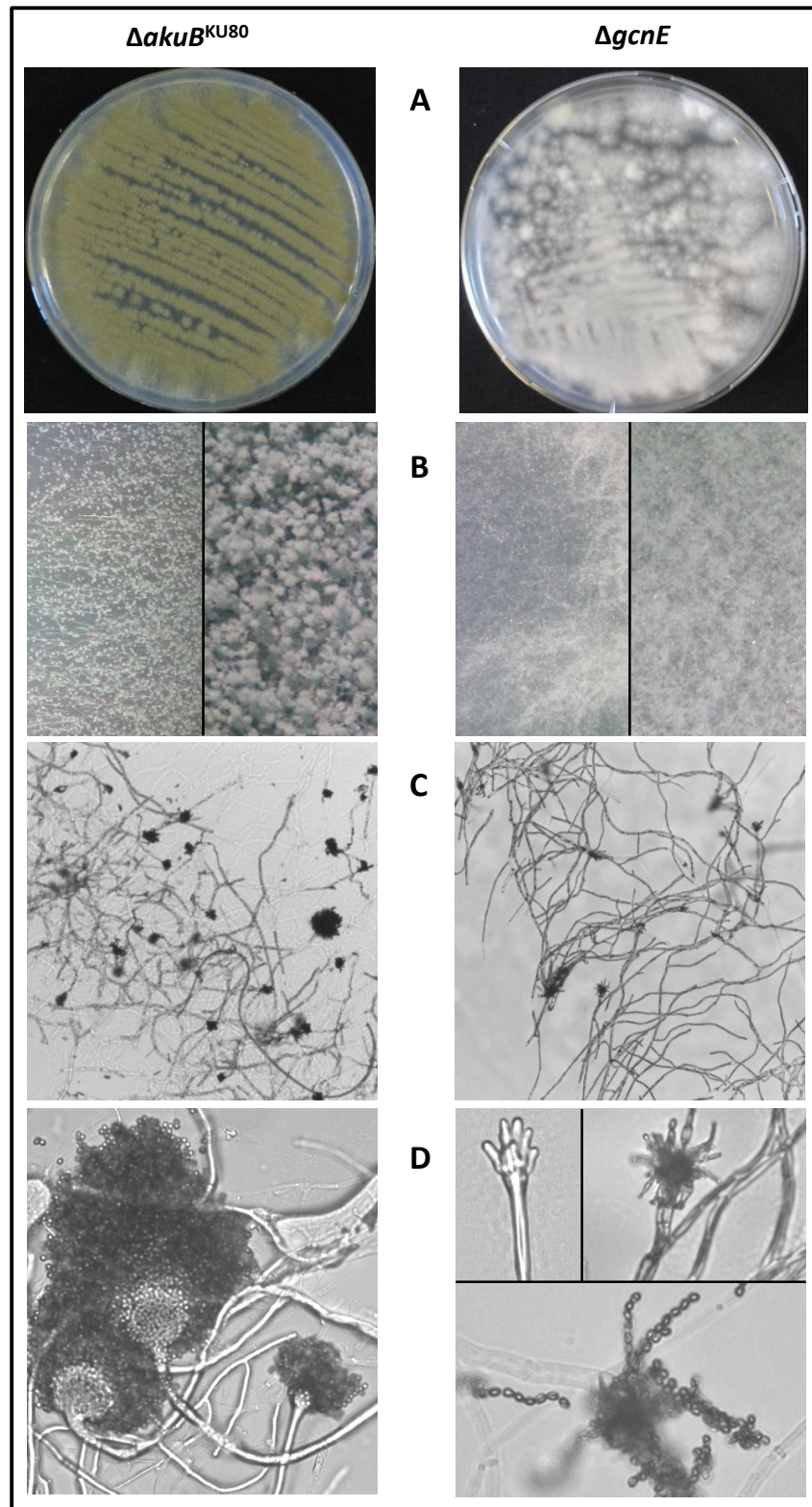


Abbildung 26: Morphologische Analyse der $\Delta gcnE$ -Mutante

Vergleich der Morphologie des *gcnE*-Deletionsstammes ($\Delta gcnE$) mit dem Rezipientenstamm CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$). **A** Wachstum auf AMM-Agar nach 5 Tagen bei 37 °C. **B** Ansicht des Myzels im Randbereich einer Kolonie und sporenenthaltender Bereich bei Betrachtung mit dem Binokular. **C** 100-fache Vergrößerung von Myzel, das an schräg im Agar platzierten Deckgläschen empor gewachsen ist. **D** Aussehen der Konidiophore bei 4-facher Vergrößerung von **C**.

Mit der Bestimmung der Auskeimungsrate der Sporen sollte die Funktion von GcnE weiter untersucht werden. Die *gcnE*-Mutante wurde dabei dem Stamm CEA17 Δ *akuB*^{KU80} gegenübergestellt (Abbildung 27A). 50 μ l eines Gemisches aus Sporen und AMM (1×10^6 Sporen/ml) wurde auf Deckgläschen gegeben und diese in einer Petrischale mit angefeuchteten Tüchern („feuchte Kammer“) bei 37 °C inkubiert. Die Auszählung der ausgekeimten Sporen begann nach 3 h und wurde anschließend stündlich wiederholt. Die Auskeimung der Δ *gcnE*-Mutante in AMM begann, wie beim Wildtyp, nach ca. 6 h, verlief aber danach viel langsamer. Die Wildtypsporen waren bereits nach 10 Stunden vollständig ausgekeimt, Sporen des *gcnE*-Deletionsstammes nach 12 Stunden jedoch erst zu ca. 94 % (Abbildung 27). Nach 24 h waren auch die Sporen des Δ *gcnE*-Stammes vollständig ausgekeimt (Abbildung 27B). Eine im Vergleich zum Wildtyp veränderte Hyphenmorphologie wurde nicht festgestellt (Abbildung 27B).

Die Ergebnisse zeigen, dass GcnE in die Entwicklung und Ausbildung der Sporen involviert ist und deshalb direkt oder indirekt auch einen Einfluss auf deren Auskeimung hat.

Für den Nachweis, ob GcnE in *A. fumigatus* für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters notwendig ist, wurde ein Kokultivierungsexperiment mit *S. rapamycinicus* durchgeführt. Im Vergleich zum Rezipientenstamm war das Wachstum des Δ *gcnE*-Stammes in AMM stark reduziert. Das Wachstum der *gcnE*-Mutante fand fast ausschließlich im Grenzbereich von Luft und Medium an der Kolbenwand statt, im Medium war nur wenig Myzel (Daten nicht gezeigt). Um dennoch eine ausreichende Myzelmenge für die Hauptkultur zu erhalten, wurde Malzmedium in der Vorkultur verwendet. Die Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* fand in AMM statt. Die Kokultivierung des *gcnE*-Deletionsstammes mit *S. rapamycinicus* zeigte nach 24 h eine deutliche Gelbfärbung des Kulturüberstandes (Abbildung 28). Mittels HPLC konnte zudem die Bildung von Fumicyclinen nachgewiesen werden (Abbildung 29B). Somit ist GcnE nicht essentiell für die Aktivierung des *fcc*-Clusters und der Fumicyclin-Produktion. Dennoch könnte die HAT für die Produktion anderer Sekundärmetabolite von *A. fumigatus* wichtig sein.

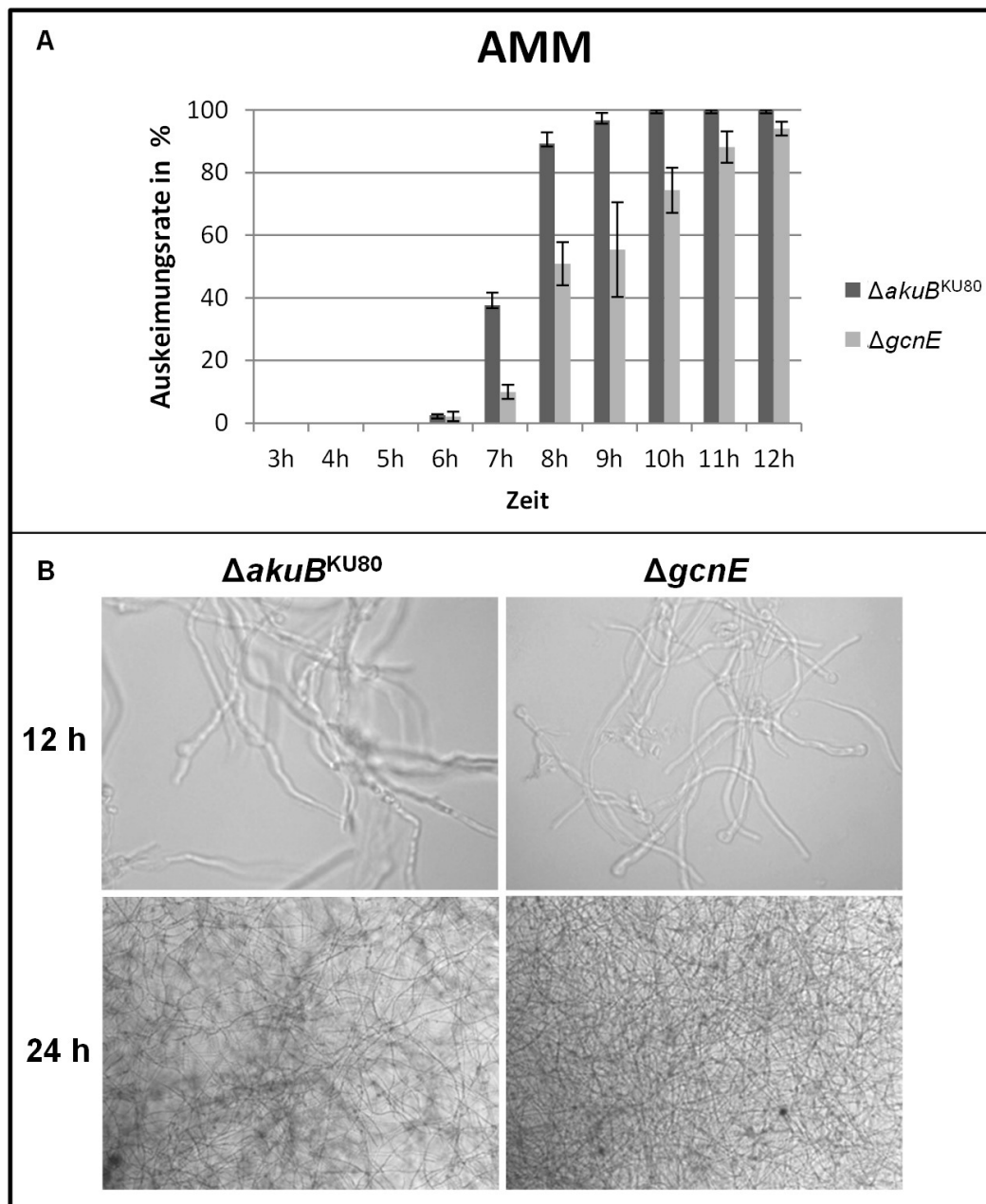


Abbildung 27: Auskeimungsrate von $\Delta gcnE$ in AMM

A Auskeimungsrate des $gcnE$ -Deletionsstammes ($\Delta gcnE$) und CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$) sowie **B** mikroskopische Ansicht der Hyphen nach 12 h und 24 h bei 37 °C in AMM (Glukose als C-Quelle).

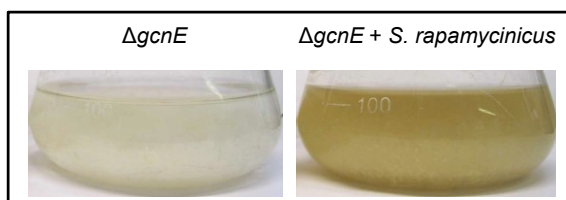


Abbildung 28: Kokultur von $gcnE$ und $S. rapamycinicus$

Einzel- und Kokultur des $gcnE$ -Deletionsstammes ($\Delta gcnE$) mit $S. rapamycinicus$ nach 24 h in AMM.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass *A. fumigatus* das Potenzial hat, mehr als 200 bioaktive Sekundärmetabolite zu bilden (Frisvad *et al.*, 2009). Der Umfang der Tests diese alle zu überprüfen, war für diese Arbeit zu groß, da der Fokus auf der Regulation des Fumicyclin-Clusters lag und bereits gezeigt werden konnte, dass diese unabhängig von GcnE erfolgt. Um zu testen, ob Fumicycline der einzige Sekundärmetabolit ist, der unabhängig von GcnE gebildet wird, wurde die Bildung von Pseurotin A, Fumagillinen und Tryprostatin sowie Gliotoxin getestet. Pseurotin A, Fumagilline und Tryprostatin konnten mehrfach in AMM-Kulturen von *A. fumigatus* dokumentiert werden (Abbildung 29; persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach; Owens *et al.* (2014)). In Czapek-Dox-Medium produziert *A. fumigatus* zudem Gliotoxin (Abbildung 29C), einen diskutierten Virulenzfaktor (Gardiner *et al.*, 2005; Scharf *et al.*, 2012).

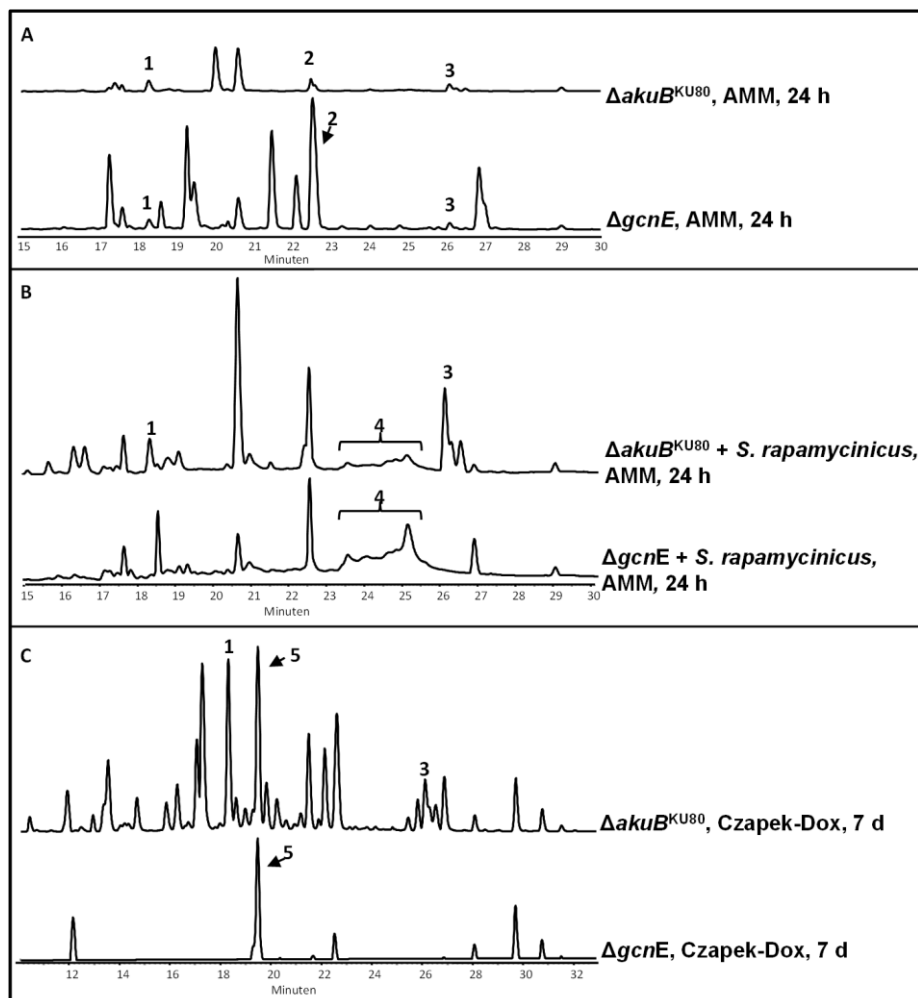


Abbildung 29: Sekundärmetabolitproduktion von $\Delta gcnE$

Metabolit-Profil von CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ ($\Delta akuB^{KU80}$) und des *gcnE*-Deletionsstammes ($\Delta gcnE$) nach 24 h in: **A** AMM **B** AMM + *S. rapamycinicus* **C** Czapek-Dox-Medium. Die Zahlen stehen für folgende Sekundärmetabolite: **1** Pseurotin A **2** Tryprostatin **3** Fumagillin **4** Fumicycline **5** Gliotoxin

Der $\Delta gcnE$ -Stamm produzierte in AMM Pseurotin A, Fumagilline und Tryprostatin und Gliotoxin in Czapek-Dox-Medium (Abbildung 29) und ist somit nicht essentiell für deren Regulation (Abbildung 29). In Czapek-Dox-Medium bildete die $\Delta gcnE$ -Mutante insgesamt weniger Metabolite als der Rezipientenstamm. Dies ist wahrscheinlich auf das insgesamt schlechte Wachstum des $\Delta gcnE$ -Stammes zurückzuführen. Es ist nicht auszuschließen, dass GcnE notwendig für die Bildung anderer Sekundärmetabolite ist. Auch wenn GcnE nicht an der Bildung von Fumicyclinen, Gliotoxin, Pseurotin A und Tryprostatin beteiligt ist, konnte gezeigt werden, dass im Deletionsstamm kein DHN-Melanin mehr produziert werden kann (Abbildung 26).

3.4 Einfluss der Eisen-Konzentration und Eisen-regulierter Gene auf die Transkription der *fcc*-Gene

Eisen ist ein essentieller Nährstoff und wichtig für viele Prozesse der Zelle (Haas, 2012). Während der Durchführung verschiedener Experimente fiel auf, dass Kokulturen mit geringen FeSO_4 -Konzentrationen tendenziell mehr Fumicycline produzierten. Dies wurde genauer durch Kokultivierungsexperimente mit *S. rapamycinicus* untersucht. Den Vor- bzw. Hauptkulturen des Pilzes wurden unterschiedliche Mengen FeSO_4 zugesetzt (Abbildung 30). Die Vorkultur enthielt mindestens 3 μM Eisen, da bereits gezeigt werden konnte, dass ohne Eisen die Biomasse im Vergleich zu Kulturen mit Eisen signifikant verringert ist (Jain *et al.*, 2011). Die Auswertung der Metabolitprofile bestätigte die früheren Beobachtungen. Die geringsten Fumicyclin-Mengen wurden in der Kultur mit 30 μM Eisen in Vor- und Hauptkultur nachgewiesen (Abbildung 30). Mit der Reduktion der Eisenmenge in Vor- und Hauptkultur nahm die Menge an gebildeten Fumicyclinen zu. Die meisten waren in der Kokultur enthalten, der in der Vorkultur nur 3 μM Eisen und der in der Hauptkultur keinerlei Eisen zugesetzt wurde. Die Eisenmenge im Medium hatte somit einen Einfluss die Fumicyclin-Produktion.

Wenn die Fumicyclin-Produktion von der Eisenkonzentration im Medium abhängig ist, sind Gene, welche die Eisenkonzentration in der Zelle regulieren, möglicherweise auch an der Signaltransduktion in *A. fumigatus* während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* beteiligt. Zwei wichtige Regulatoren der intrazellulären Eisenkonzentration in *A. fumigatus* sind HapX und SreA. Bei Eisenmangel reduziert HapX Eisen-abhängige Prozesse und induziert die Biosynthese von Siderophoren. SreA hingegen stoppt die Eisenaufnahme, wenn ausreichende

Mengen des Spurenelements im Medium vorhanden sind (Hortschansky *et al.*, 2007; Schrettl *et al.*, 2008; Schrettl *et al.*, 2010).

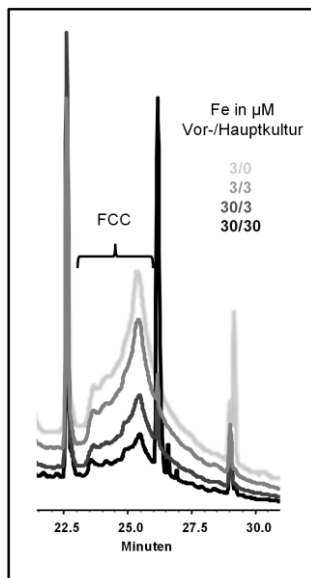


Abbildung 30: Fumicyclin-Produktion bei definierten Eisenkonzentrationen

Ausschnitt der HPLC-Profile der Kokulturen von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus* nach 24 h in AMM mit definierten Eisenmengen. Die Zahlen vor und hinter dem Schrägstrich entsprechen den Eisenkonzentrationen in μM in Vor-/Hauptkultur. Die Gruppe von Peaks, die mit den Fumicyclinen korrelierte (persönliche Mitteilung Dr. K. Scherlach), ist durch eine geschweifte Klammer und die Abkürzung FCC gekennzeichnet.

Die Transkription der Gene *fccR* (Transkriptionsfaktor) und *fccA* (PKS), sowie die Fumicyclin-Produktion in den Kokulturen der Deletions-Stämme von *hapX* ($\Delta hapX$) (Schrettl *et al.*, 2010) und *sreA* ($\Delta sreA$) (Schrettl *et al.*, 2008) mit *S. rapamycinicus* wurde überprüft. *fccR* und *fccA* wurden stellvertretend für die anderen *fcc*-Gene getestet. Nur wenn das Regulatorgen (*fccR*) transkribiert wird, ist auch die Transkription der anderen *fcc*-Gene möglich. Zudem kodiert das Gen *fccA* für die PKS, das Schlüsselenzym der Fumicyclin-Biosynthese. Als Kontrolle wurde der Stamm ATCC 46645 mitgeführt, da dieser der Rezipientenstamm für beide Mutanten war (Schrettl *et al.*, 2008; Schrettl *et al.*, 2010). Die Kokulturen enthielten entweder 30 μM FeSO_4 in Haupt- und Vorkultur (+Fe) oder 3 μM in Vor- und 0 μM FeSO_4 in der Hauptkultur (-Fe). Die Transkriptmenge wurde mit einem „Northern blot“ nach 3 h Kokultur geprüft (Abbildung 31). In der Kontroll-Kokultur (ATCC 46645 und *S. rapamycinicus*) wurde *fccR* unabhängig von der Eisenkonzentration transkribiert (Abbildung 31). Die Transkriptmenge von *fccA* war unter +Fe-Bedingungen geringer als bei -Fe. Für das Gen *fccA* konnten im $\Delta sreA$ -Stamm unter +Fe-Bedingungen geringe Mengen Transkript nachgewiesen werden. In allen anderen Proben konnten nach 3 h Kokultur keine Transkripte für *fccA* dokumentiert werden. Transkripte waren für das *fccR*-Gen in allen Proben der $\Delta hapX$ - und $\Delta sreA$ -Mutanten in teilweise sehr geringen Mengen nachweisbar (Abbildung 31). Eine Abhängigkeit der Transkriptmenge von der

Eisenkonzentration im Medium konnte wegen der schwachen Signale nicht festgestellt werden.

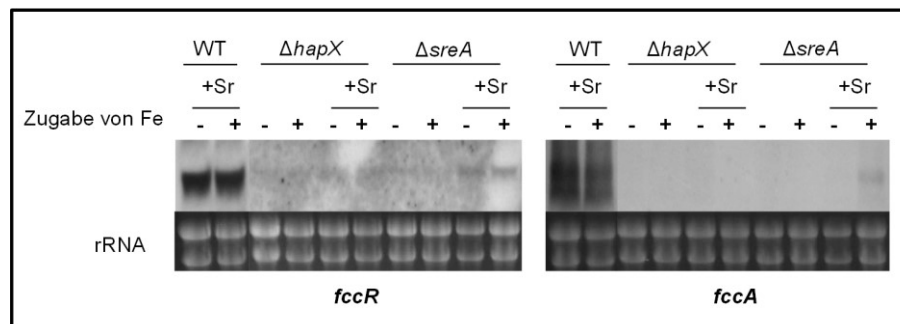


Abbildung 31: Transkriptmenge von *fccR* und *fccA* in der Kokultur der Stämme *ΔhapX* und *ΔsreA* mit *S. rapamycinicus*

Die Transkriptmenge der Gene *fccA* und *fccR* im Wildtyp ATCC 46645 (WT) und in den *hapX*- und *sreA*-Deletionsstämmen (*ΔhapX*, *ΔsreA*) in Abhängigkeit von Eisen nach 3 h Kokultur mit *S. rapamycinicus* wurde bestimmt. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle. **+Sr**: Zugabe von *S. rapamycinicus*; - : 3 μM FeSO_4 in der Vorkultur, 0 μM FeSO_4 in der Hauptkultur; +: 30 μM FeSO_4 in Vor- und Hauptkultur.

Obwohl in den Deletionsstämmen von *hapX* und *sreA* praktisch keine Transkripte von *fccR* und *fccA* nachgewiesen werden konnten, waren die Kulturüberstände der Kokulturen gelblich-braun gefärbt (Abbildung 32). Mittels HPLC wurde deshalb in Kooperation mit Dr. K. Scherlach die Bildung von Fumicyclinen getestet (Abbildung 32). In den Kokulturen des Wildtyps (ATCC 46645) und der *ΔsreA*- und *ΔhapX*-Stämme konnte sowohl bei -Fe als auch unter +Fe die Bildung von Fumicyclinen, nachgewiesen werden (grau hinterlegter Bereich in Abbildung 32, persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach). Tendenziell waren in Kulturen bei -Fe mehr Fumicycline enthalten. Die gebildete Fumicyclin-Menge war jedoch in allen Kulturen sehr gering. Der Kulturüberstand des *ΔsreA*-Stammes bei +Fe war zudem leicht rötlich. Dies ist wahrscheinlich auf die Akkumulation von Eisen, Häm und des Siderophors Ferricrocin zurückzuführen (Schrettl *et al.*, 2008). Obwohl in den Kokulturen der Stämme von *ΔhapX* und *ΔsreA* Fumicycline nachgewiesen werden konnten, ist eine Beteiligung von *SreA* und *HapX* an der Regulation der Signaltransduktion in *A. fumigatus*, die zur Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters führt, wahrscheinlich, da in diesen Stämmen die Transkription der *fcc*-Gene unter den getesteten Bedingungen fast vollständig unterdrückt war.

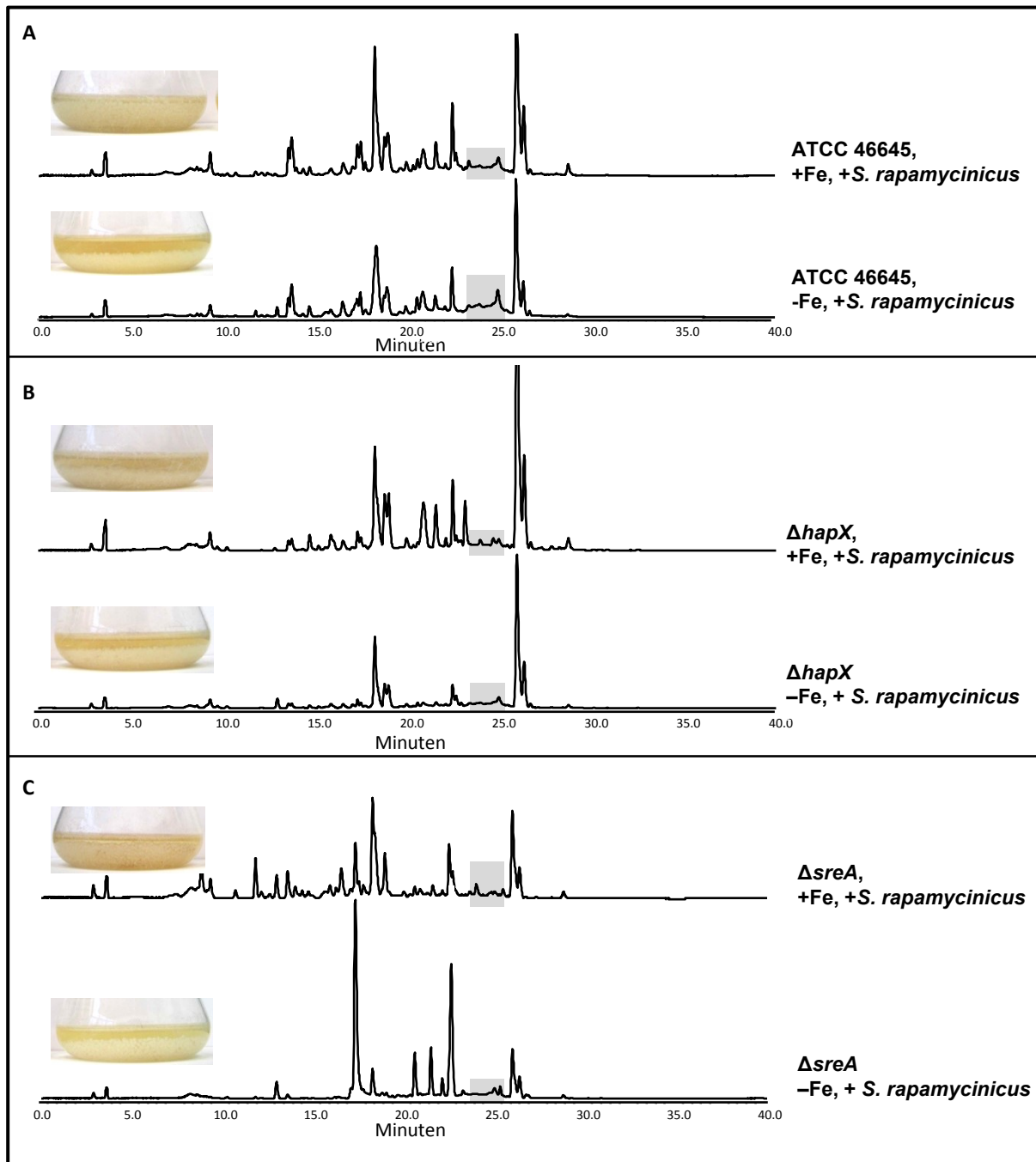


Abbildung 32: HPLC-Profil und Schüttelkolben der Kokulturen des Wildtyps (ATCC 46645), des $\Delta hapX$ - und $\Delta sreA$ -Stammes mit *S. rapamycinicus* unter +Fe- und -Fe-Bedingungen

Flüssigkulturen und deren HPLC-Analysen des Wildtyps (ATCC 46645) und der *hapX*- und *sreA*-Deletionsstämme ($\Delta hapX$, $\Delta sreA$) bei +Fe und -Fe nach 24 h Kokultur mit *S. rapamycinicus* in AMM. Der grau hinterlegte Bereich entspricht den Peaks, die mit der Gruppe der Fumicycline korrelieren. -Fe 3 μ M $FeSO_4$ in der Vorkultur, 0 μ M $FeSO_4$ in der Hauptkultur; +Fe 30 μ M $FeSO_4$ in der Vor- und Hauptkultur.

3.5 Regulatorische Effekte von MpkA auf die Transkription der *fcc*-Gene

Zelluläre Prozesse in *A. fumigatus* werden durch zahlreiche Signalwege gesteuert (Grice *et al.*, 2013). MAP-Kinasen (MAPK) regulieren z. B. die enzymatische Aktivität von Proteinen (May *et al.*, 2005). MpkA wird durch duale Phosphorylierung an konservierten Threonin- und Tyrosin-Resten aktiviert (Chang & Karin, 2001). Bereits während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass im $\Delta mpkA$ -Stamm die *fcc*-Gene fast nicht mehr transkribiert und auch keine Fumicycline in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* gebildet wurden (König, 2009). MpkA ist somit an der Signalweiterleitung, die zur Aktivierung des *fcc*-Clusters führt, beteiligt. Diese Beteiligung wurde im Rahmen dieser Dissertation weiter untersucht. Es wurde getestet, ob sich der Grad der Phosphorylierung von MpkA während der Interaktion von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus* ändert (Abbildung 33). Dafür wurden Sporen von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* in AMM bzw. M79 vorkultiviert. Das Myzel von *A. fumigatus* wurde in frisches AMM überführt, um Einflüsse von Nährstoffmangel auszuschließen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass MpkA an der Regulation der Zellwandintegrität beteiligt ist und durch mechanischen Stress aktiviert wird (Valiante *et al.*, 2008). Deshalb wurde *S. rapamycinicus* erst 1 h nach Überführung des Pilzes in frisches Medium dazugegeben, um möglichen mechanischen Stress während des Mediumwechsels abklingen zu lassen. Nach verschiedenen Zeitpunkten ($t = 0 - 120$ min) wurden Proben zur Bestimmung des Phosphorylierungsgrades genommen. Dafür wurde das entnommene Myzel der einzelnen Zeitpunkte unter Verwendung von flüssigem Stickstoff zu sehr feinem Puder mit Mörser und Pistill zermahlen, die Proteine extrahiert und eine „Western blot“-Analyse durchgeführt (Abbildung 33). Mit dem Antikörper „Phosph-p44/42 MAP Kinase“ wurde dabei spezifisch phosphoryliertes MpkA nachgewiesen. Ohne Streptomycet war der Grad der Phosphorylierung von MpkA zu allen Zeitpunkten (0 - 120 min) konstant (Abbildung 33). Wurde dem Pilz jedoch *S. rapamycinicus* zugesetzt, verringerte sich zunächst der Grad der Phosphorylierung ($t = 15$ bzw. 30 min), stieg danach wieder an und erreichte etwa 120 min nach Zugabe des Streptomyceten den ursprünglichen Aktivierungsgrad (von $t = 0$). Die Zugabe von *S. rapamycinicus* hatte somit einen Einfluss auf die Phosphorylierung und dadurch die Aktivität von MpkA.

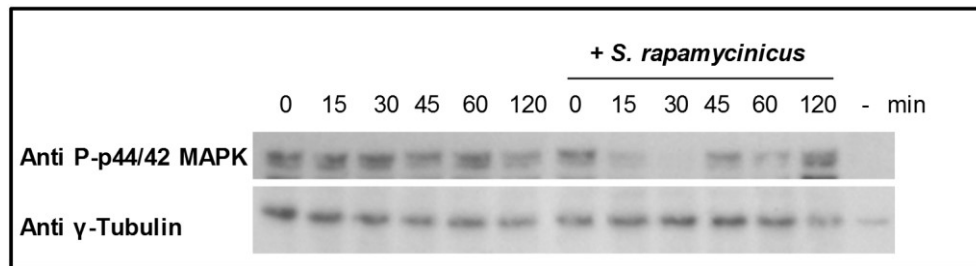


Abbildung 33: Einfluss von *S. rapamycinicus* auf die Phosphorylierung von MpkA

A. fumigatus wurde mit bzw. ohne *S. rapamycinicus* kultiviert und der Grad der Phosphorylierung von MpkA mit „Western blot“ analysiert. Der Phospho-p44/42 MAP Kinase Antikörper (Anti P-p44/42 MAPK) bindet spezifisch phosphoryliertes MpkA. Der Antikörper gegen γ -Tubulin (Anti γ -Tubulin) diente als quantitative Kontrolle. –: Negativkontrolle, *mpkA*-Deletionsstamm; min: Zeitpunkt der Probennahme

MpkA wird an den Aminosäurepositionen (AS-Positionen) Threonin186 und Tyrosin188 phosphoryliert (Valiante, unpublizierte Daten). In den Mutanten *mpkA*-T186A wurde Threonin durch Alanin und in *mpkA*-Y188F Tyrosin durch Phenylalanin ausgetauscht. Im Stamm *mpkA*-TY186/188AF wurden die AS an beiden Positionen durch Alanin bzw. Phenylalanin ersetzt. Alle AS-Austauschmutanten wurden zur Verfügung gestellt von Dr. V. Valiante (HKI, Jena). Die jeweiligen AS wurden durch strukturell ähnliche ersetzt, denen jedoch die OH-Gruppe fehlt. Dadurch können diese Positionen von MpkA nicht mehr phosphoryliert werden. Der Einfluss des Fehlens der einzelnen bzw. beider Phosphorylierungsstellen auf die Transkriptmenge der *fcc*-Gene wurde durch „Northern blot“-Analyse untersucht (Abbildung 34). Dafür wurden mit allen AS-Austauschstämmen sowie dem Stamm *CEA17ΔakuB*^{KU80} Kokultivierungen mit *S. rapamycinicus* durchgeführt und nach 3 h Kokultur wurde die Menge der gebildeten Transkripte bestimmt. Im Stamm *mpkA*-Y188F wurden in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* alle *fcc*-Gene transkribiert, aber tendenziell weniger als im Stamm *CEA17ΔakuB*^{KU80}. Wurde jedoch Threonin186 gegen Alanin ausgetauscht, waren nur noch geringe bzw. keine Transkripte der Fumicyclin-Clustergene mehr nachweisbar. Die Transkription der *fcc*-Gene der Doppelmutante (*mpkA*-TY186/188AF) war identisch mit der geringen des Δ *mpkA*-Stammes in der Kokultur (Abbildung 34). Die Daten zeigen, dass für eine vollständige Aktivierung des Fumicyclin-Clusters beide Phosphorylierungsstellen, Threonin186 und Tyrosin188, wichtig sind, jedoch von beiden Threonin186 essentiell ist.

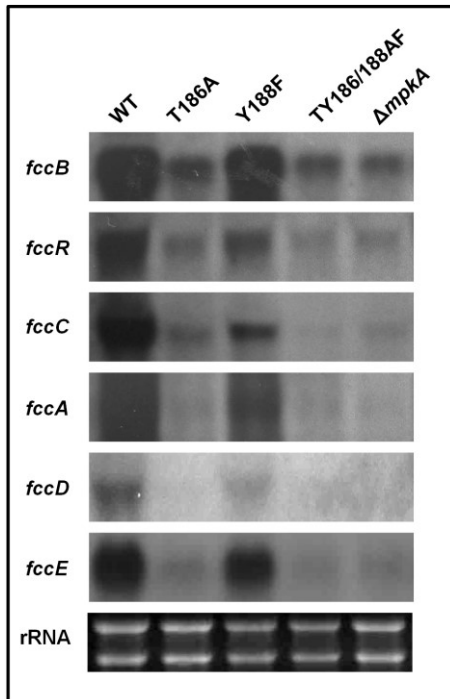


Abbildung 34: Einfluss der Phosphorylierung von MpkA auf die *fcc*-Transkriptmengen

A. *fumigatus* CEA17 Δ akuB^{KU80} (WT), der *mpkA*-Deletionsstamm (Δ *mpkA*), sowie die MpkA-Varianten (T186A, Y188F, TY186/188AF) wurden mit *S. rapamycinicus* in AMM kokultiviert. Nach 3 h wurde die Transkriptmenge der *fcc*-Gene bestimmt. Die 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Im Stamm *mpkA*-Y188F war der Kulturüberstand Fumicyclin-typisch gelblich-braun, ähnlich wie bei CEA17 Δ akuB^{KU80}. Bei der Mutante *mpkA*-T186A war die Färbung des Überstandes minimal gelb. Bei *mpkA*-TY186/188AF sowie der Δ *mpkA*-Stamm blieben die Kulturüberstände farblos (Abbildung 35). Die Phosphorylierung von Threonin186 war daher auch essentiell für die Fumicyclin-Produktion.

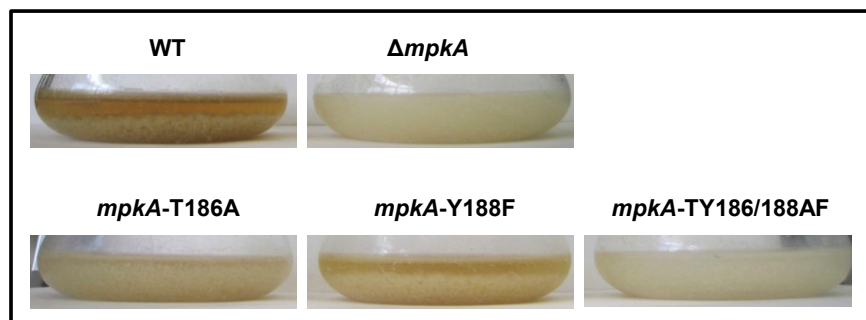


Abbildung 35: Kokulturen der Aminosäureaustauschmutanten von MpkA

A. *fumigatus* CEA17 Δ akuB^{KU80} (WT), der *mpkA*-Deletionsstamm (Δ *mpkA*), sowie die MpkA-Aminosäureaustauschstämme (*mpkA*-T186A, *mpkA*-Y188F, *mpkA*-TY186/188AF) wurden mit *S. rapamycinicus* in AMM für 24 h kokultiviert.

Die Zugabe des HDAC-Inhibitors SAHA führte auch ohne *S. rapamycinicus* zur Transkription des PKS-Gens *fccA* (Abbildung 24). Möglicherweise reguliert MpkA eine HAT, die für die Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters notwendig ist. Deshalb wurde getestet, ob SAHA die Transkription der Fumicyclin-Biosynthesegene im Δ *mpkA*-Stamm noch zu induzieren vermag

(Abbildung 36). Mit einer „Northern blot“-Analyse wurden die Transkriptmengen der *fcc*-Gene im Wildtyp und der $\Delta mpkA$ -Mutante nach 3 h und zusätzlich noch nach 4 h bestimmt. Dem Wildtyp wurde *S. rapamycinicus* oder SAHA zugegeben und diente als Kontrolle. Die $\Delta mpkA$ -Mutante wurde nur mit SAHA oder Streptomycet bzw. mit beiden Zusätzen kultiviert. In einem weiteren Versuch wurde dem Medium der Kokultur des Wildtyps und der $\Delta mpkA$ -Mutante 0,6 M KCl zugesetzt, da bereits früher eine stabilisierende Wirkung von KCl gezeigt werden konnte (Valiante *et al.*, 2008).

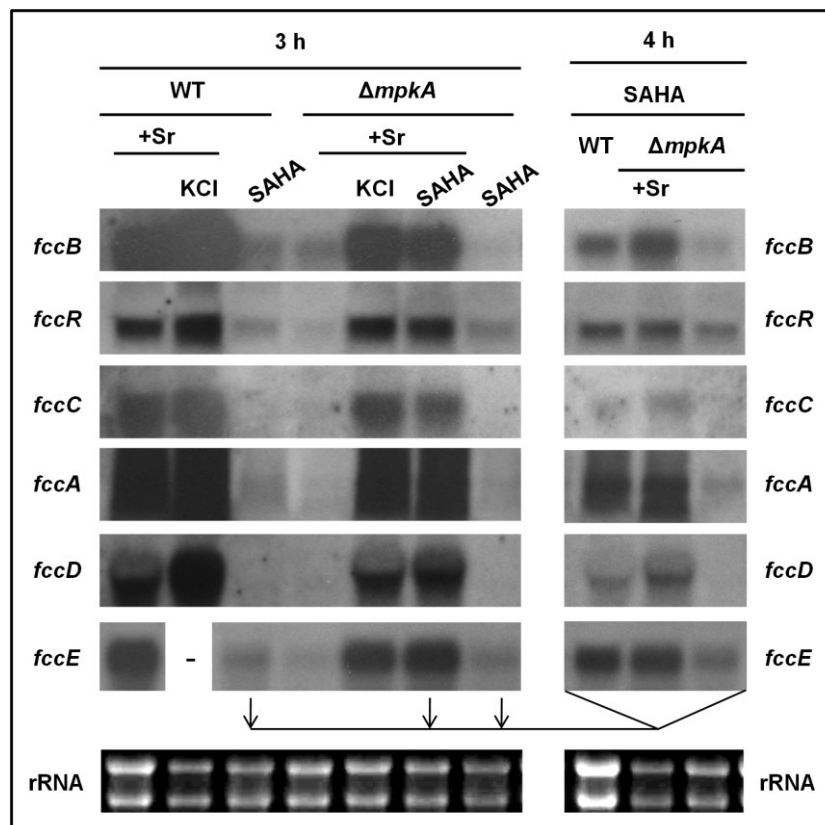


Abbildung 36: Einfluss von SAHA auf die *fcc*-Transkription im $\Delta mpkA$ -Stamm

CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ (WT) bzw. der *mpkA*-Deletionsstamm ($\Delta mpkA$) wurden in AMM bzw. AMM mit 0,6 M KCl (KCl) mit (+Sr) bzw. ohne *S. rapamycinicus* für 3 h bzw. 4 h kokultiviert. Teilweise wurde das Medium mit 2,5 mM Suberoylanilidhydroxam-Säure (SAHA) supplementiert. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Wurden dem Medium 2,5 mM SAHA zugesetzt, konnte in der 3 h-Probe des Wildtyps bzw. des $\Delta mpkA$ -Stammes keine oder nur eine geringe Transkriptmenge der *fcc*-Gene nachgewiesen werden (Abbildung 36). Nach einer Einwirkzeit von SAHA von 4 h waren im Wildtyp für alle *fcc*-Gene Transkripte nachweisbar, im $\Delta mpkA$ -Stamm waren weiterhin kaum Signale detektierbar. Im Wildtyp war die Aktivierung der *fcc*-Gene durch SAHA Zeit- bzw. Dosis-

abhängig. In einem früheren Experiment war bei einer SAHA-Konzentration von 4 mM bereits nach 3 h eine hohe Transkriptmenge von *fccA* nachweisbar (Abbildung 24). Bei der geringeren SAHA-Konzentration (2,5 mM) war eine längere Einwirkzeit für ein ähnliches Ergebnis notwendig. Es ist daher davon auszugehen, dass es bei der geringeren SAHA-Konzentration von 2,5 mM länger dauerte, eine vollständige Inhibierung der HDACs zu erreichen, als bei einer Konzentration von 4 mM. Deshalb fand vermutlich auch die Acetylierung der Histonproteine am Locus des Fumicyclin-Clusters verzögert statt. Dies erklärt, warum im Wildtyp erst nach 4 h Transkripte der *fcc*-Gene nachweisbar waren. Im $\Delta mpkA$ -Stamm induzierte weder die Zugabe von *S. rapamycinicus* noch SAHA allein die Transkription des Fumicyclin-Clusters. Nur wenn beides zugesetzt wurde, konnten Transkripte der *fcc*-Gene nachgewiesen werden (Abbildung 36). SAHA kann den Effekt der *mpkA*-Deletion der fehlenden *fcc*-Transkription nicht aufheben. Dies deutet daraufhin, dass MpkA die Aktivität von Zielproteinen z. B. einer HAT reguliert, die für die Modifikation von Histonproteinen im Bereich des Fumicyclin-Genclusters benötigt werden. Der inhibierende Effekt auf die Fumicyclin-Cluster-Aktivierung im $\Delta mpkA$ -Stamm wurde durch 0,6 M KCl im Medium aufgehoben (Abbildung 36). Für alle *fcc*-Gene war nach 3 h Kokultur mit *S. rapamycinicus* eine dem Wildtyp ähnliche Transkriptmenge nachweisbar. KCl hatte also eine positive Wirkung auf die Transkription der *fcc*-Gene. Das KCl im Medium bewirkte eine Aufhebung der Effekte hervorgerufen durch das Fehlen von MpkA, das eine Transkription der *fcc*-Gene unterdrückte.

Da *S. rapamycinicus* sowohl in *A. nidulans* als auch in *A. fumigatus* die Transkription stiller Gencluster induziert (König, 2009; Schroeckh *et al.*, 2009), lag die Vermutung nahe, dass auch die Signaltransduktionswege ähnlich sein könnten. Deshalb wurde getestet, ob MpkA auch in die Aktivierung des *ors*-Genclusters in *A. nidulans* involviert ist. Dafür wurde die Transkription des PKS-Gens *orsA* des *ors*-Clusters im *A. nidulans mpkA*-Deletionsstamm ($\Delta mpkA$) bestimmt (Abbildung 37). Die Mutante wurde mit *S. rapamycinicus* kokultiviert und das Transkriptlevel des PKS-Gens *orsA* nach 3 h untersucht (Abbildung 37). Der *A. nidulans* Wildtyp A89 diente als Kontrolle und wurde wie die Mutante behandelt. Für eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Daten des *A. fumigatus mpkA*-Stammes wurde die Kokultivierung in AMM durchgeführt. Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment der Kokultur des Wildtyps und der $\Delta mpkA$ -Mutante 0,6 M KCl zugesetzt, um zu testen ob das Salz auch in *A. nidulans* eine positive Wirkung auf die Transkription des untersuchten Gens hat.

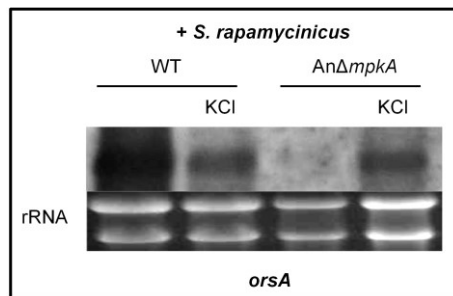


Abbildung 37: Transkription von *orsA* in *AnΔmpkA* während der Kokultivierung mit *S. rapamycinicus*
A. nidulans Wildtyp A89 (WT) und die *mpkA*-Deletionsmutante (*AnΔmpkA*) wurden in AMM bzw. AMM mit 0,6 M KCl (KCl) mit *S. rapamycinicus* für 3 h kultiviert. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrolle.

Das *orsA*-Gen wurde im Wildtyp während der Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* transkribiert (Abbildung 37). Die Zugabe von 0,6 M KCl zum Medium verringerte die Transkriptmenge im Vergleich zur Kultivierung in AMM. Im *ΔmpkA*-Stamm war für das *orsA*-Gen während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* in AMM kein Transkript nachweisbar. Auch in *A. nidulans* ist MpkA somit notwendig für die Aktivierung des Sekundärmetabolit-Genclusters (*ors*-Clusters), das während der Interaktion des Pilzes mit dem Streptomyceten induziert wird. Die Transkription des *orsA*-Gens war identisch mit der des Wildtyps, wenn beiden Kulturen 0,6 M KCl zugesetzt wurde. Im Wildtyp hatte KCl eine inhibierende Wirkung auf die Transkriptmenge des *orsA*-Gens, möglicherweise hervorgerufen durch osmotischen Stress durch den Wechsel vom AMM der Vorkultur zum AMM mit 0,6 M KCl in der Hauptkultur. Im *ΔmpkA*-Stamm hatte die Zugabe von KCl zum Medium einen stabilisierenden Effekt auf die *orsA*-Transkription. Diese Daten zeigen, dass die Signaltransduktion, die zur Aktivierung des *ors*-Clusters in *A. nidulans* und des *fcc*-Clusters in *A. fumigatus* führt, abhängig von MpkA und damit teilweise identisch ist.

3.6 Einfluss von α -Glucan auf die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters

Bereits während meiner Diplomarbeit konnte ich zeigen, dass für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters in *A. fumigatus* physischer Kontakt mit *S. rapamycinicus* notwendig ist (König, 2009). Komponenten der Zellwand könnten daher an der Interaktion und der Weiterleitung eines Signals ins Zellinnere von *A. fumigatus* beteiligt sein. Studien mit Mutanten, die wichtige Bestandteile der Zellwand nicht mehr synthetisieren, könnten helfen, diese Komponenten und deren Funktion aufzuklären.

Im $\Delta ags1/2/3$ -Stamm von *A. fumigatus* sind alle Gene, die für die Synthese von $\alpha(1-3)$ -Glucan benötigt werden, deletiert (Henry *et al.*, 2012). Die Auswirkungen der veränderten Zellwandzusammensetzung auf die Transkriptmenge des Transkriptionsfaktorgens *fccR* und des PKS-Gens *fccA* wurden stellvertretend bestimmt, da sie für die zentralen Gene der Fumicyclin-Biosynthese kodieren (Abbildung 38). Der $\Delta ags1/2/3$ -Stamm sowie der Wildtyp CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ (Kontrolle) wurden mit *S. rapamycinicus* kokultiviert und die Transkriptmengen von *fccR* und *fccA* nach 3 h bestimmt (Abbildung 38). Als Medium für die Vor- und Hauptkultur (= Kokultur) des Pilzes wurde AMM verwendet.

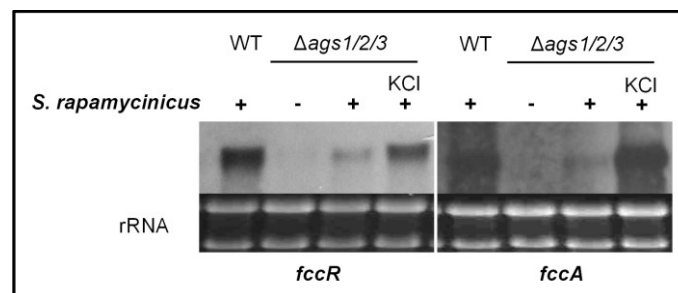


Abbildung 38: Transkriptlevel von *fccR* und *fccA* in der *ags*-Dreifachmutante

CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ (WT) bzw. die Dreifachmutante der α -Glucansynthasen ($\Delta ags1/2/3$) wurden allein (-) oder mit *S. rapamycinicus* (+) kultiviert. Bei zwei Proben wurde das AMM mit 0,6 M KCl (KCl) supplementiert. Die Proben zur Bestimmung der mRNA-Level wurden nach 3 h entnommen. 18S und 28S rRNA dienten als quantitative Kontrollen.

Im $\Delta ags1/2/3$ -Stamm wurden *fccR* und *fccA* in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* nur in geringen Mengen transkribiert (Abbildung 38). α -Glucan als Bestandteil der Zellwand scheint somit notwendig für die Transkription des Fumicyclin-Genclusters zu sein. Die Zugabe von KCl zum Medium erhöhte die Transkriptmengen von *fccR* und *fccA* im $\Delta ags1/2/3$ -Stamm. KCl konnte somit auch den inhibierenden Einfluss der Deletion aller α -Glucansynthasen auf die Transkription der *fcc*-Gene ausgleichen.

4 Virulenz des $\Delta fccA$ -Stammes im Mausinfektionsmodell

Fumicycline werden als Reaktion auf die Anwesenheit eines anderen Organismus (*S. rapamycinicus*) gebildet. Ihre physiologische Funktion ist nicht bekannt. Jedoch zeigten Fumicycline eine moderate Aktivität gegen *S. rapamycinicus* (persönliche Mitteilung von Dr. K. Scherlach). Somit könnten Fumicycline auch während der Infektion als Reaktion z. B. auf Bestandteile des Immunsystems gebildet werden. Ob Fumicycline eine Rolle bei der Infektion spielen, wurde in einem Mausinfektionsmodell (durchgeführt von Dr. M. Straßburger) mit

dem $\Delta fccA$ -Stamm getestet (Abbildung 39), da dieser keine Fumicycline mehr bilden kann (König, 2009). Dafür wurden jeweils 10 Mäuse intranasal mit 2×10^5 Sporen des Rezipientenstammes CEA17 $\Delta akuB$ bzw. des $\Delta fccA$ -Stammes infiziert. Der Infektionsverlauf wurde über einen Zeitraum von 14 Tagen beobachtet. Histologische Präparate wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten von getöteten Versuchstieren angefertigt. Als Kontrolle wurde eine Gruppe von Versuchstieren nur mit PBS behandelt.

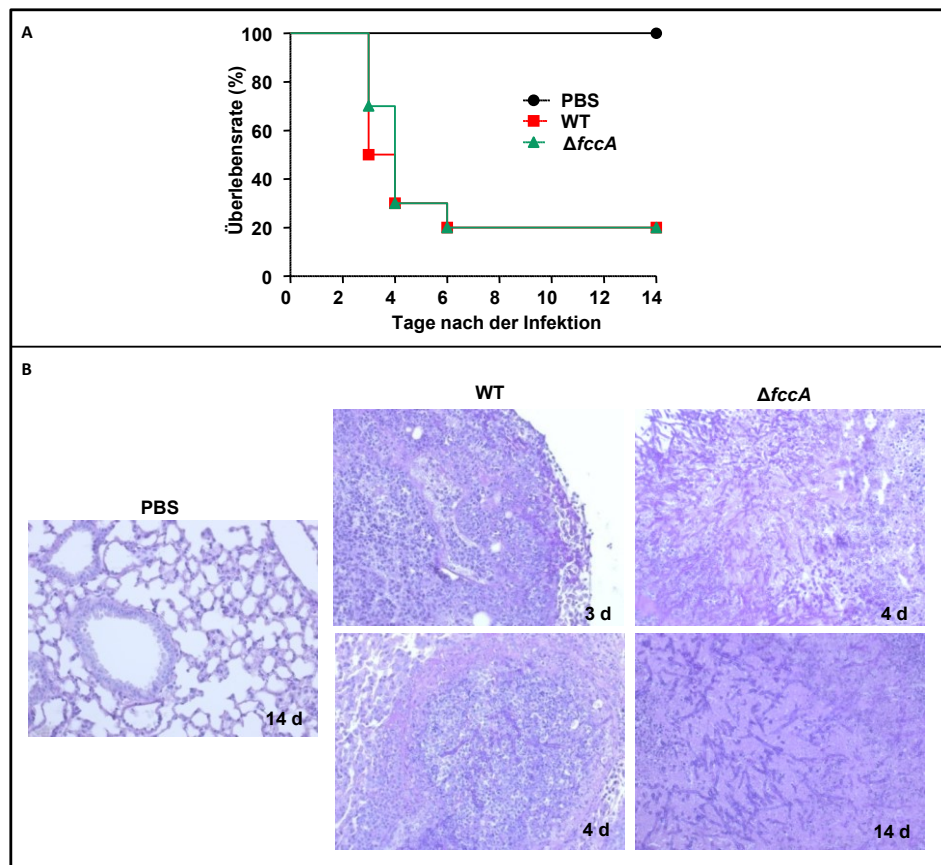


Abbildung 39: Virulenz des $\Delta fccA$ -Stammes in einem Mausinfektionsmodell

Mit Cortisonacetat immunsupprimierte Mäuse wurden intranasal mit 2×10^5 Konidien des CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ (WT) und der $\Delta fccA$ -Mutante infiziert und der Infektionsverlauf über einen Zeitraum von 14 Tagen verfolgt (A). Zu einigen Zeitpunkten wurden zudem histologische Präparate angefertigt (B). **PBS:** Kontrolle

Im Cortisonacetat-Infektionsmodell zeigte der $\Delta fccA$ -Stamm keine veränderte Virulenz im Vergleich zu CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ (Abbildung 39A). Die histologische Auswertung ergab, dass die Lungen infizierter Mäuse (CEA17 $\Delta akuB^{KU80}$ bzw. $\Delta fccA$) pathologisches Material enthielten. In den zerstörten Bereichen der Alveolaren konnten Pilzhypen identifiziert werden (Abbildung 39B, persönliche Mitteilung von Dr. M. Straßburger). Es ist anzunehmen, dass Fumicycline während der Infektion keine Rolle spielen.

5 Die Verbreitung des Fumicyclin-Clusters in anderen Mikroorganismen

Die Bildung von Fumicyclinen war für *A. fumigatus* vor dieser Arbeit nicht beschrieben. Um einen Überblick darüber zu bekommen, ob die Gene spezifisch in *A. fumigatus* vorkommen oder auch in anderen Pilzen verbreitet sind, wurde eine Ähnlichkeits-Analyse durchgeführt. Dafür wurden für die genomischen Situationen (komplettes Gen mit Exonen und Intronen), für die Transkripte (nur Exonen) und für die Proteine (AS-Abfolge) eine Analyse mit dem Programm Basic Local Alignment Search Tool (BLAST, Altschul *et al.* (1990)) durchgeführt. Die Ergebnisse der Analyse der Genom-Sequenzen sind in Tabelle 10, für die Transkript-Sequenzen in Tabelle 11 und für die Protein-Sequenzen in Tabelle 12 zusammengestellt. Die Einträge sind nach ihrem „Expect“ (E)-Wert sortiert. Für die Proteine sind alle Resultate mit einer Ähnlichkeit von $\geq 60\%$ aufgelistet. Eine grafische Zusammenstellung der Ergebnisse der Ähnlichkeits-Analyse mit den Vertretern mit den meisten Übereinstimmungen zum Fumicyclin-Cluster ist in Abbildung 40 dargestellt. Für jedes Gen (Genom), jede mRNA (Transkript) und jede Proteinsequenz (Protein) wurde angegeben, in welchen Organismen sich Homologe fanden. Die relative Reihenfolge der Organismen spiegelt auch die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu *A. fumigatus* wider.

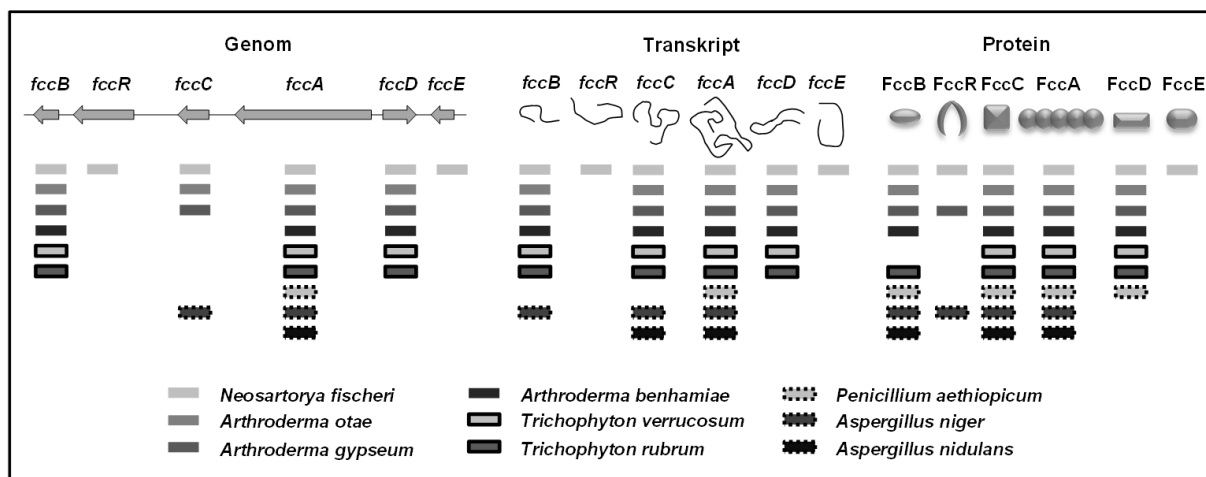


Abbildung 40: Verbreitung von fcc-homologen Genen im Pilzreich

Mit der genomische Sequenz bestehend aus Exonen und Intronen (Genom), der mRNA-Sequenz (Transkript) und der Abfolge der AS (Protein) jedes Gens bzw. Proteins des Fumicyclin-Clusters wurde eine Ähnlichkeits-Analyse mit dem Programm BLAST durchgeführt. Für Nukleotid-Sequenzen wurde blastn und für die Protein-Sequenz blastp verwendet. Jede Farbe repräsentiert einen bestimmten Organismus. Die Aufschlüsselung des Farbcodes ist im unteren Bildbereich angegeben. Die relative Reihenfolge der Organismen spiegelt auch die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu *A. fumigatus* wider.

Ähnlichkeiten zum Fumicyclin-Cluster wurden nur in pilzlichen Genomen identifiziert. Die größte Ähnlichkeit zum Fumicyclin-Cluster zeigte sich auf Protein-, die geringste auf Genom-Ebene. Die größte Ähnlichkeit zur *A. fumigatus*-Protein-Sequenz des Fumicyclin-Clusters hatte das Alignment mit *N. fischeri*. Die Ähnlichkeiten der Sequenzen beider Organismen schwankten für die einzelnen Enzyme zwischen 87 % und 97 %. Die Ähnlichkeiten der Sequenzen zu anderen Organismen lagen bei 60 - 70 %. Homologe Gencluster wurden auch in einigen Dermatophyten identifiziert, z. B. *Arthroderma otae*, *A. benhamiae* und *A. gypseum*. Mit *A. niger*, *A. nidulans* und *A. kawachii* enthielten auch noch andere Vertreter des Genus *Aspergillus* homologe Gene des *fcc*-Clusters. Die Gene mit der höchsten Ähnlichkeit in *A. nidulans* waren AN6000.2 (*aptA*), AN6001.2 (*aptB*) und AN6002.2 (*aptC*). Diese bilden das Asperthecin-Cluster (Szewczyk et al., 2008).

Für jedes Gen bzw. Protein des Fumicyclin-Clusters in *A. fumigatus*, gibt es ein homologes Äquivalent in *N. fischeri* (Abbildung 40). Der Transkriptionsfaktor (*fccR*/*FccR*) und die Epimerase/Dehydratase (*fccE*/*FccE*) sind in den aufgeführten Mikroorganismen am wenigsten konserviert. Nur in *N. fischeri* entsprach die Ähnlichkeit der Homologen ca. 90 %. Die PKS *FccA* hatte in allen aufgelisteten Organismen eine homologe Entsprechung, wobei die Ähnlichkeit zu *A. fumigatus* zwischen 63 % z. B. für *Penicillium aethiopicum* und 80 % für *A. otae*, bzw. 95 % in *N. fischeri* variierte. Neben der PKS wies die Monooxygenase den höchsten Konservierungsgrad in den aufgelisteten Mikroorganismen auf, gefolgt von der DMAT. Das Fumicyclin-Cluster ist somit nicht spezifisch für *A. fumigatus*. Homologe Cluster sind auch in Vertretern der Euratiales (*Aspergillus* und *Penicillium*) sowie Onygenales (*Trichophyton* und *Arthroderma*) vorhanden (McLaughlin et al., 2009).

Tabelle 10: blastn-Analyse der Genom-Sequenzen

Für jedes Gen des *fcc*-Clusters wurde eine blastn-Suche durchgeführt. Aufgeführt sind die Treffer mit den höchsten Alignment-Scores über die Gesamtlänge der Sequenz, sortiert nach dem E-Wert.

<i>A. fumigatus</i> Locus	Homolog zu	E- Wert	Ähnlichkeit (%)
7G00120 (<i>fccB</i>)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 metallo-beta-lactamase superfamily protein (NFIA_112270) partial mRNA	0.0	88%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 metallo-beta-lactamase superfamily protein, mRNA	3e ⁻⁹⁹	69%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 metallo-beta-lactamase domain protein, putative, mRNA	2e ⁻⁸²	71%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 metallo-beta-lactamase domain protein, putative, mRNA	5e ⁻⁷⁸	71%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 metallo-beta-lactamase (TERG_08360) mRNA, complete cds	1e ⁻⁷²	70%

	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 hypothetical protein (MGYG_06591) mRNA, complete cds	1e-48	68%
7G00130 (fccR)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 C6 transcription factor, putative (NFIA_112260) partial mRNA	0.0	92%
7G00150 (fccC)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 FAD binding domain protein (NFIA_112250) partial mRNA	0.0	91%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 FAD binding domain-containing protein, mRNA	2e-77	73%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 FAD binding domain-containing protein (MGYG_06590) mRNA, complete cds	8e-51	72%
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 FAD binding domain protein partial mRNA	4e-48	71%
7G00160 (fccA)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 polyketide synthase, putative (NFIA_112240) partial mRNA	0.0	95%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase, mRNA	0.0	75%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase (MGYG_06588) mRNA, complete cds	0.0	73%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 polyketide synthase (TERG_08357) mRNA, complete cds	0.0	73%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 polyketide synthase, putative, mRNA	0.0	72%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 polyketide synthase, putative, mRNA	0.0	72%
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 polyketide synthase partial mRNA	0.0	70%
	<i>Penicillium aethiopicum</i> strain IBT 5753 viridicatumtoxin biosynthetic gene cluster, complete sequence	0.0	68%
	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 polyketide synthase <i>aptA</i> AN6000.2 partial mRNA	0.0	68%
7G00170 (fccD)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 dimethylallyl tryptophan synthase, putative (NFIA_112230) partial mRNA	0.0	95%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 dimethylallyl tryptophan synthase GliD1, mRNA	2e-140	70%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 dimethylallyl tryptophan synthase GliD1 (MGYG_06589) mRNA, complete cds	2e-109	68%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 dimethylallyl tryptophan synthase (TERG_08358) mRNA, complete cds	1e-94	67%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 hypothetical protein, mRNA	4e-87	67%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 hypothetical protein, mRNA	8e-83	66%
7G00180 (fccE)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 NAD dependent epimerase/dehydratase, putative (NFIA_112220) partial mRNA	0.0	93%

Tabelle 11: blastn-Analyse der Transkript-Sequenzen

Für jedes Transkript des *fcc*-Clusters wurde eine blastn-Suche durchgeführt. Aufgeführt sind die Treffer mit den höchsten Alignment-Scores über die Gesamtlänge der Sequenz, sortiert nach dem E-Wert.

A. fumigatus Transkript	Homolog zu	E-Wert	Ähnlichkeit
7G00120 (fccB)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 metallo-beta-lactamase superfamily protein (NFIA_112270) partial mRNA	0.0	92%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 metallo-beta-lactamase domain protein, putative, mRNA	2e-94	69%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 metallo-beta-lactamase superfamily protein, mRNA	2e-88	72%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 metallo-beta-lactamase (TERG_08360) mRNA, complete cds	4e-85	70%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 metallo-beta-lactamase domain protein, putative, mRNA	2e-82	71%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 hypothetical protein (MGYG_06591) mRNA, complete cds	1e-67	67%
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 metallo-beta-lactamase domain protein partial mRNA	6e-51	68%
7G00130 (fccR)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 C6 transcription factor, putative (NFIA_112260) partial mRNA	0.0	92%

7G00150 (fccC)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 FAD binding domain protein (NFIA_112250) partial mRNA	0.0	94%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 FAD binding domain-containing protein, mRNA	2e-146	70%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 FAD binding domain-containing protein (MGYG_06590) mRNA, complete cds	8e-89	68%
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 FAD binding domain protein partial mRNA	3e-88	67%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 hypothetical protein, mRNA	5e-66	66%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 hypothetical protein, mRNA	2e-65	66%
	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 monooxygenase aptC AN6002.2 partial mRNA	3e-63	66%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 FAD-dependent monooxygenase (TERG_08359) mRNA, complete cds	1e-60	66%
7G00160 (fccA)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 polyketide synthase, putative (NFIA_112240) partial mRNA	0.0	94%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase, mRNA	0.0	75%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 polyketide synthase (TERG_08357) mRNA, complete cds	0.0	72%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase (MGYG_06588) mRNA, complete cds	0.0	72%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 polyketide synthase, putative, mRNA	0.0	72%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 polyketide synthase, putative, mRNA	0.0	72%
	<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88 polyketide synthase partial mRNA	0.0	70%
	<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4 polyketide synthase aptA AN6000.2 partial mRNA	0.0	67%
	<i>Penicillium aethiopicum</i> strain IBT 5753 viridicatumtoxin biosynthetic gene cluster, complete sequence; and unknown genes	0.0	68%
7G00170 (fccD)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 dimethylallyl tryptophan synthase, putative (NFIA_112230) partial mRNA	0.0	95%
	<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480 dimethylallyl tryptophan synthase GliD1, mRNA	2e-140	70%
	<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893 dimethylallyl tryptophan synthase GliD1 (MGYG_06589) mRNA, complete cds	2e-109	68%
	<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892 dimethylallyl tryptophan synthase (TERG_08358) mRNA, complete cds	1e-94	67%
	<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371 hypothetical protein, mRNA	4e-87	67%
	<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517 hypothetical protein, mRNA	8e-83	66%
7G00180 (fccE)	<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181 NAD dependent epimerase/dehydratase, putative (NFIA_112220) partial mRNA	0.0	93%

Tabelle 12: blastp-Analyse der Protein-Sequenzen

Für jedes Protein des fcc-Clusters wurde eine blastp-Suche durchgeführt. Aufgeführt sind die Treffer mit den höchsten Alignment-Scores über die Gesamtlänge der Sequenz, sortiert nach dem E-Wert. Bei einer hohen Trefferzahl wurden nur Proteine mit einer Mindestähnlichkeit von 60 % aufgeführt.

A. fumigatus Locus	Homolog zu	E-Wert	Ähnlichkeit
FccB (Metallo-β-Lactamase ähnliche Thioesterase)	metallo-beta-lactamase superfamily protein [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	95%
	metallo-beta-lactamase superfamily protein [<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480]	2e-155	64%
	metallo-beta-lactamase [<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818]	6e-154	67%
	metallo-beta-lactamase domain protein, putative [<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371]	8e-154	68%
	metallo-beta-lactamase [<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892]	2e-151	66%
	hypothetical protein MGYG_06591 [<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893]	4e-150	66%
	metallo-beta-lactamase domain protein AdaB [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	4e-145	64%
	metallo-beta-lactamase superfamily protein [<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF23]	1e-143	62%
	metallo-beta-lactamase domain protein [<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308]	1e-142	61%
	hydrolase AptB AN6001.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	2e-140	63%
	metallo-beta-lactamase domain protein [<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102]	2e-140	61%
	VrtG [<i>Penicillium aethiopicum</i>]	3e-136	58%
FccR	C6 transcription factor, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	87%
	C6 zinc finger domain-containing protein [<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893]	0.0	46%

(Transkriptionsfaktor)	C6 transcription factor [<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308]	0.0	43%
	C6 transcription factor [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	4e ⁻¹⁷⁸	43%
FccC (FAD-abh. Monooxygenase)	FAD binding domain protein [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	94%
	FAD-dependent monooxygenase [<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308]	0.0	67%
	FAD binding domain protein [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	0.0	67%
	AdaC [<i>Aspergillus niger</i>]	0.0	67%
	FAD binding domain-containing protein [<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480]	0.0	70%
	FAD-dependent monooxygenase [<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818]	0.0	67%
	hypothetical protein ARB_00536 [<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371]	0.0	67%
	FAD-dependent monooxygenase [<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892]	0.0	66%
	hypothetical protein TRV_00388 [<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517]	0.0	66%
	FAD binding domain-containing protein [<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893]	0.0	66%
	monooxygenase AptC AN6002.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	8e ⁻¹⁷⁹	60%
	VrtH [<i>Penicillium aethiopicum</i>]	3e ⁻¹⁷⁵	60%
FccA (Polyketid-synthase)	polyketide synthase, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	96%
	conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase [<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480]	0.0	80%
	polyketide synthase [<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892]	0.0	76%
	polyketide synthase, putative [<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371]	0.0	76%
	polyketide synthase, putative [<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517]	0.0	75%
	conidial yellow pigment biosynthesis polyketide synthase [<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893]	0.0	77%
	polyketide synthase [<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818]	0.0	76%
	polyketide synthase [<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97]	0.0	75%
	polyketide synthase, putative [<i>Metarhizium acridum</i> CQMa 102]	0.0	66%
	polyketide synthase, putative [<i>Metarhizium anisopliae</i> ARSEF 23]	0.0	65%
	polyketide synthase [<i>Aspergillus niger</i> CBS 513.88]	0.0	66%
	AdaA [<i>Aspergillus niger</i>]	0.0	66%
	polyketide synthase [<i>Aspergillus kawachii</i> IFO 4308]	0.0	66%
	polyketid synthase AptA AN6000.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	0.0	66%
	VrtA [<i>Penicillium aethiopicum</i>]	0.0	63%
FccD (Dimethylallyl-tryptophan-synthase)	dimethylallyl tryptophan synthase, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	97%
	dimethylallyl tryptophan synthase GliD1 [<i>Arthroderma otae</i> CBS 113480]	0.0	67%
	dimethylallyl tryptophan synthase GliD1 [<i>Arthroderma gypseum</i> CBS 118893]	0.0	66%
	hypothetical protein ARB_00537 [<i>Arthroderma benhamiae</i> CBS 112371]	0.0	65%
	dimethylallyl tryptophan synthase GliD1 [<i>Trichophyton equinum</i> CBS 127.97]	0.0	65%
	dimethylallyl tryptophan synthase [<i>Trichophyton tonsurans</i> CBS 112818]	0.0	65%
	hypothetical protein TRV_00387 [<i>Trichophyton verrucosum</i> HKI 0517]	0.0	65%
	dimethylallyl tryptophan synthase [<i>Trichophyton rubrum</i> CBS 118892]	0.0	64%
	VrtC [<i>Penicillium aethiopicum</i>]	5e ⁻¹³⁹	47%
FccE Epimerase	NAD dependent epimerase/dehydratase, putative [<i>Neosartorya fischeri</i> NRRL 181]	0.0	93%
	hypothetical protein AN2116.2 [<i>Aspergillus nidulans</i> FGSC A4]	4e ⁻⁹⁴	48%

Diskussion

1 Das Bakterium *Streptomyces rapamycinicus* induziert die Bildung von Fumicyclinen im Pilz *Aspergillus fumigatus*

In Monokulturen nutzen viele Pilze ihr Potenzial, Sekundärmetabolite zu bilden, meist nicht annähernd aus (Scherlach *et al.*, 2013). Viele Sekundärmetabolit-Gencluster sind still und werden unter Standard-Laborbedingungen nicht transkribiert (Craney *et al.*, 2013). In den letzten Jahren konnte vielfach gezeigt werden, dass die Kokultivierung von Mikroorganismen ein aussichtsreiches System ist, diese stillen Cluster zu aktivieren und neue Sekundärmetabolite zu identifizieren (Bertrand *et al.*, 2014).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, resultierte aus der Kokultivierung des Pilzes *A. fumigatus* mit dem Bakterium *S. rapamycinicus* die Bildung einer Gruppe von gelben Metaboliten, den Fumicyclinen. Als Einzelkultur produzierte *A. fumigatus* diese Substanzen nicht. Die physiologische Funktion der Fumicycline konnte nicht eindeutig geklärt werden. Jedoch zeigten sie eine moderate Aktivität gegen *S. rapamycinicus* und sind daher möglicherweise ein Teil der Abwehrmechanismen von *A. fumigatus*. Jedoch ist nicht auszuschließen, dass sie auch Signalmoleküle sind. So konnte für Jadomycin B, ein Angucyclin Antibiotikum von *Streptomyces venezuelae*, gezeigt werden, dass es in nicht-inhibitorischen Konzentrationen ein Signalmolekül in der Interaktion mit *S. coelicolor* ist (Wang *et al.*, 2014).

A. fumigatus wurde auch bereits mit anderen Streptomyceten kokultiviert. Zuck *et al.* konfrontierten *A. fumigatus* mit verschiedenen anderen Organismen auf ISP2-Agarplatten und in Flüssigmedium. Einen signifikanten Effekt zeigte die Kultivierung mit *Streptomyces peucetius* (Zuck *et al.*, 2011). Mehrere Sekundärmetabolite konnten während der Interaktion beider Organismen nachgewiesen werden, darunter das neu identifizierte Xanthocillin-Analog, Fumiformamid. Die Autoren konnten den Produzenten der Metaboliten nicht eindeutig benennen. Jedoch waren Pilze bereits als Ursprung anderer Xanthocillin-Derivate bzw. Fumiformamid-Analoga bekannt. Ein anderes Set von Sekundärmetaboliten produzierte *A. fumigatus* in der Kokultur mit *Streptomyces bullii* (Rateb *et al.*, 2013). In der Kokultur wurden Derivate von Brevinamiden, Tryprostatin und Fumitremorgin sowie Verruculogen gebildet. Keine der Substanzen pilzlichen Ursprungs, die während der Interaktion von

A. fumigatus mit *S. bullii* gebildet wurden, konnten in der Kokultur mit *S. peucetius* nachgewiesen werden und umgekehrt. Fumicycline oder strukturell ähnliche Metabolite wurden in keiner der Kokulturen (mit *S. peucetius* bzw. *S. bullii*) isoliert. Die physiologische Funktion dieser Metabolite für bzw. die Regulation ihrer Bildung in *A. fumigatus* wurde in diesen Studien nicht aufgeklärt. Die Beispiele verdeutlichen jedoch, wie spezifisch die jeweiligen Interaktionen sind. Abhängig vom Interaktionspartner (*S. rapamycinicus*, *S. peucetius*, *S. bullii*) reagierte *A. fumigatus* mit einem anderen Set an Naturstoffen. Dies deutet auf eine gezielte Antwort auf einen bestimmten externen Reiz hin, der spezifisch für den jeweiligen Streptomyceten ist.

Dass nicht nur die Signale des bakteriellen Partners spezifisch sind, verdeutlichten auch die Kokultivierungsexperimente von *S. rapamycinicus* mit anderen *Aspergilli*. In *N. fischeri* konnte ebenfalls die Bildung einer dem Fumicyclin ähnlichen Substanz durch Kultivierung mit dem Streptomyceten induziert werden. Es ist wahrscheinlich, dass in *A. fumigatus* und *N. fischeri* der Aktivierungsmechanismus dieser Sekundärmetabolit-Gencluster sehr ähnlich ist, da beide Spezies taxonomisch nah verwandt und die gebildeten Substanzen strukturell fast identisch sind (Peterson, 2008; Chooi *et al.*, 2013; König *et al.*, 2013). Der Streptomycet konnte jedoch keine mit *A. fumigatus* und *N. fischeri* vergleichbare Antwort in *A. clavatus*, *A. versicolor* und *A. oryzae* hervorrufen.

1.1 FccR ist der Transkriptionsfaktor des *fcc*-Clusters und der Regulator der Fumicyclin-Biosynthese

Der Transkriptionsfaktor in der Nähe eines Sekundärmetabolit-Genclusters ist nicht automatisch der Regulator der Biosynthesegene. Es wurde vermutet, dass das Gen *orf-g* im Pilz *Lecanicillium sp.* HF627 der Transkriptionsaktivator des Verlamelin-Clusters ist (Ishidoh *et al.*, 2014). Im Deletionsstamm dieses Zn(II)₂Cys₆-Transkriptionsfaktors wurden jedoch weiterhin Verlameline gebildet. Der tatsächliche Regulator dieser Gene konnte nicht identifiziert werden.

Im Fumicyclin-Cluster kodiert das Gen *fccR* (AFUA_7G00130) für einen putativen Transkriptionsfaktor. Die Analyse der Aminosäure-Sequenz des korrespondierenden Proteins FccR offenbarte zudem eine DNA-Bindedomäne. In Kulturen des Deletionsstammes von *fccR* wurden die *fcc*-Gene nicht mehr transkribiert und keine Fumicycline gebildet. Damit konnte

bestätigt werden, dass FccR essentiell für die Transkription des Fumicyclin-Clusters und die Biosynthese dieser Sekundärmetabolite ist.

Der Beweis, dass FccR ausreichend für die Fumicyclin-Biosynthese ist, wurde mit einem Überexpressionsstamm des *fccR*-Gens (*OEfccR*) geführt. Das *fccR*-Gen wurde durch einen induzierbaren Promotor kontrolliert. Dadurch konnte der Zeitpunkt der Induktion der Transkription des Regulators bestimmt werden und eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit Wildtyp-Experimenten wurde erreicht.

Unter induzierenden Bedingungen (Acetat als C-Quelle) wurden im *OEfccR*-Stamm alle Fumicyclin-Biosynthesegene transkribiert und Fumicycline gebildet. FccR war somit ausreichend für die Transkription dieser Gene und die Entstehung des Cluster-Produkts. Die Resultate der Experimente mit dem $\Delta fccR$ - und dem *OEfccR*-Stamm bestätigten, dass es sich bei FccR um den Transkriptionsfaktor der *fcc*-Gene und damit auch um den Regulator der Fumicyclin-Biosynthese handelt.

Gerke *et al.* (2012) konnten zeigen, dass durch einen Defekt im Protein-Abbau das Antibiotikum 2,4-Dihydroxy-3-methyl-6-(2-oxopropyl)benzaldehyd (DHMBA) gebildet wird. Die Autoren vermuten, dass der Defekt im Protein-Abbau zu einer erhöhten Stabilität unter anderem auch von Enzymen von Sekundärmetabolit-Genclustern, wie Transkriptionsfaktoren, führt (Gerke *et al.*, 2012). Dies würde auch erklären, warum im Überexpressionsstamm *OEfccR* die Fumicyclin-Produktion durch Zugabe von *S. rapamycinicus* noch gesteigert werden konnte. Es ist denkbar, dass die Biosyntheseeenzyme der Fumicycline eine kurze Halbwertszeit haben und schnell degradiert werden. Bezogen auf die Interaktion mit *S. rapamycinicus* heißt das, dass der Streptomycet diese Enzyme z. B. durch Inhibition des Abbaus, stabilisiert.

1.2 FccB, FccC, FccD und FccE modifizieren das Produkt der Polyketidsynthase FccA

1.2.1 FccB katalysiert die Abspaltung der Fumicycline von der PKS

Bei nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPSs) und PKSs katalysiert eine Thioesterase- oder eine Reduktase-Domäne die Freisetzung der Peptidkette bzw. des Polyketids (Walsh, 2008; Sato *et al.*, 2013). Es gibt jedoch auch PKSs, denen diese Domänen fehlen (Crawford *et al.*, 2008). Diese Typ I Nicht-reduzierenden (NR)-PKSs besitzen nur eine Ketosynthase (KS)-, eine Acyltransferase (AT)- und eine Acyl-Carrier Protein (ACP)- Domäne. Die Thioesterase (TE)- bzw. Claisen-Zyklisierungsdomäne (CLC) fehlt. Die TE/CLC-Domäne ist jedoch wichtig für die Freilassung des Polyketids von der PKS durch eine Claisen-Kondensation, gefolgt von der

Bildung einer C-C-Bindung und Spaltung der Thioester-Bindung zwischen der ACP-Domäne der PKS und dem Polyketid (Fujii *et al.*, 2001; Korman *et al.*, 2010; Lim *et al.*, 2012). Wenn PKSs diese Domänen fehlen, wird diese Funktion in der Regel von Enzymen der Metallo- β -Lactamase Superfamilie, auch Metallo- β -Lactamase-Typ Thioesterasen (M β L-TE) genannt, übernommen (Awakawa *et al.*, 2009). Thioesterasen können in 25 Familien (TE1 – TE25) unterteilt werden (Cantu *et al.*, 2011). Thioesterasen mit einer Metallo- β -Lactamase Domäne, wie auch bei FccB, gehören zur Familie TE23. Diese besitzen eine Lactamase-Faltung und hydrolysieren Bindungen zwischen Acyl-Gruppen und Gluthation-Derivaten (Cantu *et al.*, 2010). Thioesterasen dieser Familie kommen in Archäen, Bakterien und Eukaryoten vor (Carfi *et al.*, 1995). Es konnte gezeigt werden, dass diese Enzyme bifunktional sind und sowohl die Claisen-Kondensation als auch die Thioesterase-Spaltung katalysieren können (Li *et al.*, 2011). Die meisten M β L-TE nutzen Zn^{2+} -Kationen. Bei AptB der Asperthecin-Biosynthese in *A. nidulans* sind jedoch zwei Mn^{2+} -Kationen involviert (Li *et al.*, 2011). M β L-TE sind auch an der Biosynthese von Endocrocin (EncB) von *A. fumigatus*, Monodictyphenon (MdpF) von *A. nidulans*, Atrochrysoncarboxylsäure (ACTE) von *A. terreus* und Naphthacendion (AdaB) in *A. niger* beteiligt (Szewczyk *et al.*, 2008; Awakawa *et al.*, 2009; Chiang *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2011; Lim *et al.*, 2012).

Die PKS FccA besteht nur aus einer AT-, KT- und ACP-Domäne und gehört damit zur Gruppe der Typ I NR-PKS (Abbildung 42) (König, 2009). Die Abspaltung des Polyketids von FccA muss also von einem anderen Gen-Produkt übernommen werden. Die zu Grunde liegenden Daten weisen daraufhin, dass die M β L-TE FccB diese Funktion innerhalb der Fumicyclin-Biosynthese übernimmt. Die Deletion des korrespondierenden Gens ($\Delta fccB$) hatte einen signifikanten Einfluss auf die Fumicyclin-Produktion. Obwohl in der $\Delta fccB$ -Mutante alle weiteren *fcc*-Clustergene transkribiert wurden, konnten nur sehr geringe Mengen an Fumicyclinen in der Kokultur nachgewiesen werden. Die Fumicyclin-typische Gelbfärbung des Kulturüberstandes fehlte ebenfalls. Wenn das Polyketid an der PKS durch das Fehlen von FccB verankert bliebe, könnte es nicht mehr aus der Pilzhyphe ausgeschleust werden und die Gelbfärbung des Kulturüberstandes bliebe aus. Es kann spekuliert werden, dass geringe Mengen an Fumicyclinen nachgewiesen werden konnten, da bei der Aufarbeitung für die HPLC-Messung die gesamte Kultur, also Myzel und Medium verwendet wurden. Ähnliche Beobachtungen konnten auch für die Thioesterase VImB des Verlamelin-Clusters von *Lecanicillium sp.* HF627

gemacht werden (Ishidoh *et al.*, 2014). Das Verlamelin-Cluster besteht aus vier Genen (VlmA, VlmB, VlmC und VlmS). Während in den Deletionsstämmen von $\Delta vlmA$, $\Delta vlmC$ und $\Delta vlmS$ keine Verlameline gebildet wurden, enthielt die Deletion der Thioesterase VlmB ($\Delta vlmB$) noch ca. 5 % der Menge des Wildtyps. Zusammenfassend kann angenommen werden, dass nachdem die PKS FccA das Polyketidgrundgerüst gebildet hat, FccB die Thioesterbindung zwischen dem Polyketid und der ACP-Domäne von FccA unter Verwendung von Wasser spaltet (Abbildung 41).

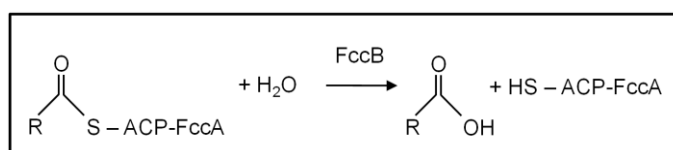


Abbildung 41: FccB katalysiert die Abspaltung des Polyketids von FccA

FccB ist eine Thioesterase und gehört zur Familie der Metallo- β -Lactamasen. Das Enzym spaltet die Thioester-Bindung zwischen der Acyl-Carrier Protein-Domäne (ACP) der PKS FccA und dem Grundgerüst des Polyketids (R) unter Verwendung von H_2O .

1.2.2 FccC ist eine Flavin-abhängige Monooxygenase und hydroxyliert ein Zwischenprodukt der Fumicyclin-Biosynthese

Die zu FccC homologe Monooxygenase NscC katalysiert in *Neosartorya fischeri* wahrscheinlich die Hydroxylierung des C2-Atoms des Polyketids Neosartoricin stereospezifisch (Chooi *et al.*, 2013). Die Flavin-abhängige Monooxygenase AdaC des Naphtacendion-Clusters von *A. niger* ist homolog zu FccC und katalysiert wahrscheinlich, ähnlich wie NcsC, die Hydroxylierung am C2 des Polyketids (Awakawa *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011). In *Penicillium aethiopicum* katalysiert die, ebenfalls zu FccC orthologe Flavin-abhängige Oxidoreduktase VrtH, ebenfalls die Hydroxylierung eines C-Atoms (Chooi *et al.*, 2010). Eine Aussage über die genaue Funktion der putativen Monooxygenase FccC in der Fumicyclin-Biosynthese war nicht möglich, da im Deletionsstamm $\Delta fccC$ keine Fumicyclin-Derivate nachweisbar waren. Ausgehend von den Funktionen der Monooxygenasen in *N. fischeri* und *P. aethiopicum* katalysiert FccC die Hydroxylierung eines Fumicyclin-Zwischenproduktes. Dieses war jedoch nicht nachweisbar, obwohl alle Gene transkribiert wurden und der Überstand der Kokultur mit *S. rapamycinicus* gelb war. Dies ist durch eine veränderte Stabilität gebildeter Fumicyclin-Derivate zu erklären. Ähnliches wurde bereits für die Biosynthese von Endocrocin, einem anderen Sekundärmetaboliten von *A. fumigatus* beschrieben. War die Monooxygenase EncC deletiert,

konnte Endocrocinanthron nicht zu Endocrocin oxidiert werden (Lim *et al.*, 2012). Im Deletionsstamm von $\Delta encC$ konnte, wie im $\Delta fccC$ -Stamm, das Polyketid nicht mehr detektiert werden. Nur der Nachweis von instabilen Anthron-Derivaten war teilweise möglich. Die Asperthecin-Biosynthese in *A. nidulans* geschieht ebenfalls über Endocrocin-Derivate (Szewczyk *et al.*, 2008). Die zu FccC orthologe Monooxygenase AptC, katalysiert die Oxidation von Endocrocin-9-Anthron zu Endocrocin (Szewczyk *et al.*, 2008). Im *aptC*-Deletionsstamm konnten keine Zwischenprodukte der Asperthecin-Biosynthese nachgewiesen werden. Endocrocin-9-Anthron ist in Lösung instabil und war während der Aufreinigung verloren gegangen (Steglich & Reininger, 1970; Szewczyk *et al.*, 2008). Diese Beispiele zeigen, dass die von Monooxygenasen katalysierte Funktion die chemischen Eigenschaften und damit die Stabilität von Sekundärmetaboliten beeinflussen kann. Es ist daher anzunehmen, dass im $\Delta fccC$ -Stamm instabile Zwischenprodukte der Fumicyclin-Biosynthese entstehen und diese bei der Aufreinigung verloren gehen, bzw. degradiert werden.

1.2.3 FccD ist eine Dimethylallyltryptophansynthase und katalysiert die Prenylierung der Fumicycline

Im Deletionsstamm der putativen DMAT FccD waren keine Fumicycline detektierbar, obwohl alle Gene transkribiert wurden und der Überstand der Kokultur mit *S. rapamycinicus* gelb war. Somit war ein experimenteller Nachweis, welcher Schritt der Fumicyclin-Biosynthese von FccD katalysiert wird, nicht möglich. In *N. fischeri* katalysiert die orthologe polycyclische Prenyltransferase NscD die Addition der Dimethylallyl-Gruppe an das aromatische C5-Atom (Chooi *et al.*, 2013). Die aromatische Prenyltransferase VrtC in *P. aethiopicum* ist ebenfalls homolog zu FccD (*A. fumigatus*) und NscD (*N. fischeri*) und katalysiert wahrscheinlich den Transfer einer Geranyl-Gruppe an einen aromatischen C-Ring (Chooi *et al.*, 2010). Es ist daher wahrscheinlich, dass FccD ebenso in *A. fumigatus* die Prenylierung eines C-Atoms eines aromatischen Ringes (siehe Abbildung 42) katalysiert. Die Tatsache, dass die Fumicyclin-Derivate Fumicyclin A und Fumicyclin B an einem aromatischen C-Ring prenyliert sind, unterstützt diese Vermutung (Abbildung 42). Weder für VrtC noch NscC sind Deletionsmutanten beschrieben. Es ist daher nicht bekannt, ob durch Deletion dieser Enzyme die korrespondierenden Sekundärmetabolite, Neosartoricin bzw. Viridikatuntoxin weiterhin isoliert werden können. Ein eindeutiger Rückschluss, weshalb im $\Delta fccD$ -Stamm von *A. fumigatus* keine Fumicycline mehr gebildet werden können, war daher nicht möglich.

Die vollständige Abwesenheit eines Sekundärmetaboliten durch Deletion der im Cluster lokalisierten DMAT konnte jedoch bereits in anderen Mikroorganismen beobachtet werden. In *Streptomyces roseochromogenes* wird die Prenyltransferase CloQ für die Biosynthese von Clorobiocin benötigt (Pojer *et al.*, 2003). Im Deletionsstamm konnten weder Clorobiocin noch andere chemisch ähnliche Stoffe identifiziert werden. Dass die Fumicycline in *A. fumigatus* und Clorobiocin in *S. roseochromogenes* mit HPLC nicht mehr detektiert werden konnten, ist möglicherweise auf veränderte chemische Eigenschaften der Sekundärmetabolite zurückzuführen, da die Prenylierung die Lipophilie des Metaboliten erhöht (Botta *et al.*, 2005). Fumicyclin-Derivate ohne Prenyl-Gruppe sind somit weniger lipophil. Dadurch würde sich auch ihre Löslichkeit in organischen Lösungsmitteln, wie dem während der Aufreinigung der Kulturen verwendeten Ethylacetat verringern. Dies würde erklären, warum durch HPLC keine Fumicycline im $\Delta fccD$ -Stamm nachweisbar waren.

1.2.4 Im $\Delta fccE$ -Stamm findet die Anreicherung eines Zwischenproduktes statt

Im $\Delta fccE$ -Stamm sind Fumicycline weiterhin detektierbar. Welcher Schritt der Fumicyclin-Biosynthese durch die Epimerase/Dehydratase katalysiert wird, konnte nicht eindeutig bestimmt werden, da im HPLC-Spektrum des $\Delta fccE$ -Stammes weiterhin eine Gruppe von Fumicyclinen gebildet wurde und die Aufreinigung eines einzelnen Derivates nicht möglich war. Die Vermutung lag nahe, dass die Tautomerisierung der Fumicycline auf die Aktivität der Epimerase FccE zurückzuführen ist und im $\Delta fccE$ -Stamm die Anreicherung eines Zwischenproduktes der Fumicyclin-Biosynthese stattfindet. Die Anreicherung eines Zwischenproduktes bei einer Retentionszeit von ca. 25,5 Minuten fand statt, jedoch waren weiterhin auch andere Derivate nachweisbar. Ob es sich dabei um Tautomerisierungs- oder Abbau-Produkte der Fumicyclin-Biosynthese handelte, konnte nicht geklärt werden. Die Funktion von NcsE, dem homologen Protein der Neosartoricin-Biosynthese in *N. fischeri* (Chooi *et al.*, 2013) ist nicht beschrieben und somit war ein Ableiten der katalysierten Reaktion nicht möglich. Das Protein NmrA von *A. nidulans* besitzt, wie FccE, eine Rossmann-Faltung und zeigte die größte Ähnlichkeit zu Dehydrogenasen/Reduktasen, speziell zur UDP-Galaktose 4-Epimerase (Stammers *et al.*, 2001). Jedoch konnte gezeigt werden, dass dieses Enzym eher transkriptions-regulatorische Eigenschaften besitzt. Die Daten aus den während dieser Arbeit durchgeführten Experimenten bestätigten eine solche Funktion für FccE dagegen nicht, da die Transkription der anderen *fcc*-Gene im $\Delta fccE$ -Stamm identisch mit dem Wildtyp war. Die

Rossmann-Faltung, eine typische Struktur einer Nicotinamid-Nukleotid-Bindestelle, ist wichtig für Redoxenzyme (Muramatsu *et al.*, 2005). Die genaue Funktion der NAD-abhängige Oxidoreduktase GsfK des Griseofulvin-Clusters von *P. aethiopicum* ist nicht geklärt. Sie katalysiert jedoch wahrscheinlich eine stereospezifische Reduktion, was eine Konformationsänderung an einem C-Ring bewirkt (Chooi *et al.*, 2010). Eine ähnliche Funktion übernimmt die Epimerase CetB aus *Actinomyces* sp. strain Lu 9419. Dieses Enzym katalysiert die Epimerisierung einer OH-Gruppe aus der 2-epi-5-epi in die 5-epi-Position im Valiolon-Molekül (Wu *et al.*, 2009). Auch bei der Biosynthese von Vancomycin katalysiert die Epimerase EvaD eine Epimerisierung (Merkel *et al.*, 2004). Da die vorgelegten Daten eine regulatorische Funktion von FccE nicht unterstützen, katalysiert sie wahrscheinlich die Konformationsänderung eines Fumicyclin-Derivates.

1.3 Biosyntheseweg der Fumicycline

Fumicycline sind Meroterpenoide, das sind Polyketide mit terpenem Anteil (Kaysser *et al.*, 2012). *A. fumigatus* bildet neben Fumicyclinen auch das Meroterpenoid Pyripyropen (Itoh *et al.*, 2010). In anderen Pilzen sind Meroterpenoide ebenso weit verbreitet. *A. terreus* produziert Terretonin und Territrem (Chen *et al.*, 1999) und *A. nidulans* Austinol und das Derivat Dehydroaustinol (Lo *et al.*, 2012). Auch bei den Sekundärmetaboliten Viridicatumtoxin und Neosartoricin, deren Biosynthese-Gencluster homolog zum Fumicyclin-Cluster sind, handelt es sich um Meroterpenoide (Chooi *et al.*, 2010; Chooi *et al.*, 2013). Vergleicht man die chemischen Strukturen von Fumicyclin A und B mit den putativen Funktionen der im *fcc*-Cluster lokalisierten Enzyme, ist davon auszugehen, dass die im Cluster lokalisierten Gene mit den Loci AFUA_7G00120 bis AFUA_7G00180 ausreichend für die Biosynthese der Fumicycline sind (Abbildung 42).

Auf Grund der vorgelegten Daten, den annotierten Domänen der im Cluster lokalisierten Enzyme und ausgehend von den Biosynthesen orthologer Sekundärmetabolite, wie Neosartoricin (Chooi *et al.*, 2013), Viridicatumtoxin (Chooi *et al.*, 2010), Asperthecin (Szewczyk *et al.*, 2008) und Naphtacendion (Li *et al.*, 2011) wurde ein Syntheseweg für die Fumicycline abgeleitet (Abbildung 42). Das Starter-Molekül der Fumicyclin-Biosynthese ist wahrscheinlich Acetyl-CoA. Durch Assemblierung an der Polyketidsynthase FccA mit 9 Einheiten Malonyl-CoA entsteht daraus ein Dekaketid. Die M β L-TE FccB hydrolysiert über ihre Thioesterase-Aktivität das Polyketid von FccA. Das entstehende Polyphenol wird anschließend durch die FAD-

abhängige Monooxygenase FccC hydroxyliert und die DMAT FccD prenyliert. Als Donor für den Prenyl-Rest fungiert wahrscheinlich Dimethylallylpyrophosphat (DMAPP) (Unsöld & Li, 2005; Luk & Tanner, 2009; Steffan *et al.*, 2009; Steffan & Li, 2009). Die Mehrheit der charakterisierten DMATs transferiert einen Prenyl-Rest an Tryptophan oder ein Indol (Kremer *et al.*, 2007; Luk & Tanner, 2009). FccD katalysiert jedoch die Prenylierung eines aromatischen Anthracenons, ähnlich wie für NscD bei der Biosynthese von Neosartoricin und VrtC bei der von Viridicatumtoxin beschrieben (Chooi *et al.*, 2010; Chooi *et al.*, 2013). Ausgehend von den Beobachtungen von Chooi *et al.* (2013) findet die Hydroxylierung nach der Prenylierung statt. Bei der Biosynthese von Neosartoricin entstand nur so die Anthracenon- anstatt einer Naphthacendion-Struktur (Chooi *et al.*, 2013). Durch die genannten Modifikationen entsteht Fumicyclin B. Fumicyclin A wiederum könnte durch Wasserabspaltung von Fumicyclin B entstehen (Abbildung 42).

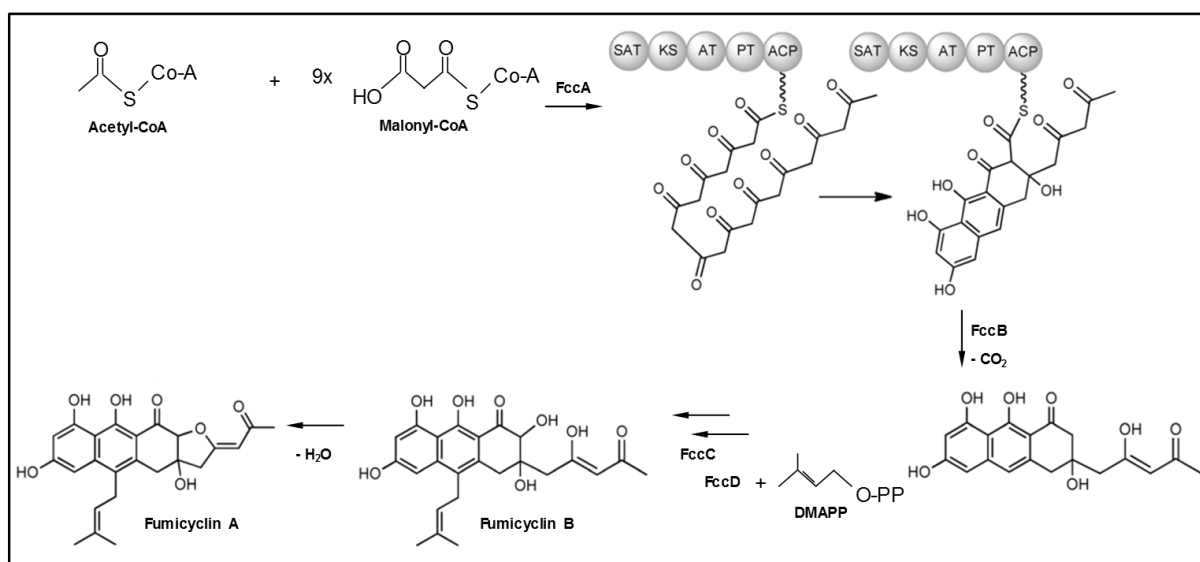


Abbildung 42: Prognostizierte Biosynthese der Fumicycline A und B

Die Biosynthese der Fumicycline beginnt durch Assemblierung des Starter-Moleküls Acetyl-CoA und 9 Einheiten Malonyl-CoA an der PKS FccA, ein Dekaketid entsteht. Dieses wird durch die Thioesterase des Metallo- β -Lactamase-Typs FccB von FccA hydrolysiert. Anschließend finden Modifikationen durch FccD (Prenylierung durch Anheften von DMAPP) und FccC (Hydroxylierung) statt, wodurch Fumicyclin B entsteht. Fumicyclin A entsteht wahrscheinlich durch H₂O Abspaltung aus Fumicyclin B.

SAT – Starter-Acyltransferase **AT** – Acyltransferase **KS** – Ketosynthase **PT** – Product Template **ACP** – Acyl-Carrier-Protein **DMAPP** – Dimethylallylpyrophosphat

2 Regulation der Aktivierung des Fumicyclin-Clusters

Sekundärmetabolit-Gencluster in *Aspergillus* Spezies sind häufig an den Telomeren lokalisiert (Fernandes *et al.*, 1998). Durch Chromatin-modellierende Substanzen konnte die Sekundärmetabolit-Produktion induziert und eine Vielzahl neuer Metabolite identifiziert werden (Fisch *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010; Vervoort *et al.*, 2011). Die Funktion solcher Substanzen gibt auch Einblicke in die Regulation der Biosynthesen dieser Sekundärmetabolite. Durch Deletion bzw. Inhibition von HDACs wurde die Transkription telomer gelegener Sekundärmetabolit-Gencluster begünstigt (Shwab *et al.*, 2007). Telomer ferne Sekundärmetabolit-Gencluster wurden dadurch aber nicht beeinflusst (Shwab *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008). Das Fumicyclin-Cluster ist am telomeren Ende von Chromosom 7 lokalisiert. Telomer gelegene Bereiche der Chromosomen sind für Histon-modifizierende Substanzen besser zugänglich als zentromer gelegene Gene (Bernstein *et al.*, 2000; Palmer *et al.*, 2010). Wie die Untersuchungen mit HAT- und HDAC-Inhibitoren nahe legen, wird die Aktivität des Fumicyclin-Clusters durch Histon-modifizierende Enzyme reguliert. Das Fumicyclin-Cluster ist ca. 30 kb vom Chromosomen-Ende entfernt (bestimmt mit CADRE, www.cadre-genomes.org.uk). Auch das *ors*-Cluster in *A. nidulans*, das während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* aktiviert wird (Schroeckh *et al.*, 2009), ist mit einer Entfernung von 200 kb telomer gelegen (bestimmt mit CADRE, www.cadre-genomes.org.uk). Das Asperthecin-Cluster in *A. nidulans*, das homolog zum Fumicyclin-Cluster ist, liegt ca. 1500 kb vom Telomer entfernt (bestimmt mit CADRE, www.cadre-genomes.org.uk). SAHA-ähnliche Substanzen, die möglicherweise vom Streptomycceten während der Interaktion eingeschleust werden, hätten auf diese distal gelegenen Gene keinen Einfluss (Shwab *et al.*, 2007; Williams *et al.*, 2008). Dies könnte erklären, warum während der Interaktion von *A. nidulans* und *S. rapamycinicus* das Asperthecin-Cluster nicht aktiviert wird. Neben Transkriptionsstudien wurde auch die Fumicyclin-Produktion von Kulturen, die SAHA enthielten, überprüft. Unabhängig von der Konzentration dieses HDAC-Inhibitors waren keine Fumicycline nachweisbar. Allerdings war nach 24 Stunden auch bei der geringsten SAHA-Konzentration noch ein Überschuss des HDAC-Inhibitors im Medium vorhanden (König, 2009). Dies erschwerte die Identifizierung weiterer Metabolite, da sie von SAHA überlagert wurden. Kulturen, die SAHA enthielten, zeigten keine Fumicyclin-typische Gelbfärbung des Kulturüberstandes. Das könnte auf eine inhibitorische Wirkung von SAHA auf Grund des Überschusses zurückgeführt werden. Durch die Hemmung

der HDACs wurde wahrscheinlich nicht nur der Sekundärstoffwechsel, sondern auch viele andere Prozesse der Zelle beeinflusst. Es konnte bereits gezeigt werden, dass SAHA eine antiproliferative Wirkung besitzt (Wang *et al.*, 2013). Auf Grund ihrer inhibitorischen Effekte werden HDAC-Inhibitoren wie SAHA zudem in der Krebstherapie eingesetzt (Licciardi *et al.*, 2013). Mit den Daten, die mit Hilfe des OE*fccR*-Stammes gewonnen wurden, konnte überdies gezeigt werden, dass bei der Fumicyclin-Biosynthese nicht nur die Transkription der *fcc*-Gene, sondern auch posttranslationale Modifikationen eine Rolle spielen. Auch unter induzierenden Bedingungen konnte die Fumicyclin-Menge durch Zugabe des Streptomyceten nochmal gesteigert werden. Die Ergebnisse der Experimente mit SAHA legen nahe, dass diese Modifikationen nicht erfolgten, wenn der HDAC-Inhibitor statt *S. rapamycinicus* zugesetzt wurde. Zusätzlich zur Aktivierung der *fcc*-Gene scheint der Streptomycet auch die Translation der Fcc-Enzyme zu beeinflussen, SAHA jedoch nicht.

Die präsentierten Daten implizieren, dass unter Standard-Laborbedingungen der *fcc*-Locus in einem deacetylierten Zustand vorlag, wodurch die Transkription der *fcc*-Gene nicht aktiviert wurde. Durch Zugabe von SAHA bzw. durch Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* konnte die Transkription jedoch induziert werden. *S. rapamycinicus* scheint somit zum einen eine Acetylierung bzw. die Inhibition der Deacetylierung der Histonproteine im Bereich des *fcc*-Locus zu induzieren und zum anderen möglicherweise die Translation der Biosyntheseeenzyme zu unterstützen. Da bereits gezeigt werden konnte, dass für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters direkter Kontakt zwischen *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* bestehen muss (König, 2009), schleust der Streptomycet während der Interaktion möglicherweise eine Substanz ein, z. B. mit SAHA-ähnlicher Wirkung. Dabei hätte es sich um Trichostatin A (TSA) handeln können. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Streptomyceten diesen HDAC-Inhibitor produzieren (Tsuji *et al.*, 1976). Die Zugabe von TSA hatte jedoch nicht zur Aktivierung des PKS-Gens *fccA* geführt (König, 2009). Dessen ungeachtet gibt es zahlreiche Beispiele, in denen Bakterien die Genexpression eines Interaktionspartners beeinflussen. *Bacillus anthracis* unterdrückt z. B. die Immunantwort der Wirtszellen durch Phosphorylierung des Histons H3, hervorgerufen durch das „lethal toxin“ (Raymond *et al.*, 2009). *Anaplasma phagocytophilum* moduliert die Genexpression der Wirtszellen durch Einschleusung des Proteins AnkA, welches wiederum Chromatin-modifizierende Proteine, wie Deacetylasen und Methyltransferasen, mobilisiert (Sinclair *et al.*, 2014). Und auch das Listeriolysin O von *Listeria monocytogenes* unterdrückt die

Wirtsabwehr durch vermehrte Dephosphorylierung bzw. Deacetylierung von den Histonen H3 bzw. H4 (Hamon *et al.*, 2007). Diese Beispiele haben eines gemeinsam. Die Genexpression des Interaktionspartners wird stets zum Vorteil des Bakteriums verändert. Da die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters sehr spezifisch erfolgt, ist davon auszugehen, dass *S. rapamycinicus* einen Nutzen von der Fumicyclin-Bildung hat.

2.1 Charakterisierung der $\Delta gcnE$ -Deletion in *A. fumigatus*

Gcn5 ist eine hochkonservierte Histonacetyltransferase (HAT) in Eukaryoten, die in viele Prozesse involviert ist (Candau *et al.*, 1996; Sterner & Berger, 2000). In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* reguliert Gcn5 z. B. die Beseitigung von DNA-Schäden durch Photoreaktivierung und Nukleotidexzisionsreparatur (Teng *et al.*, 2002). AcuA, ein Gcn5-ähnliches Protein im Actinomyceten *Saccharopolyspora erythraea* reguliert durch reversible Acetylierung von Lysinresten der AMP-bildenden Acetyl-Coenzyme A-Synthetase deren Aktivität posttranslational (You *et al.*, 2014). Im Pilz *Candida glabrata* ist Gcn5 wiederum spezifisch in die Regulation von AMT1 involviert (Koch *et al.*, 2001). Dieses Enzym ist essentiell für die Detoxifizierung von hohen Kupfer-Konzentrationen. In *S. cerevisiae* und *A. nidulans* ist Gcn5 bzw. das homologe GcnE Bestandteil des Multiuntereinheiten SAGA/ADA-Komplexes (Syntichaki & Thireos, 1998). Für *A. fumigatus* ist dieser Komplex bisher nicht beschrieben.

Als Bestandteil des SAGA/ADA-Komplexes ist GcnE essentiell für die Aktivierung des *ors*-Clusters in *A. nidulans* während der Kultivierung mit *S. rapamycinicus* (Nützmann *et al.*, 2011). Die Daten der HAT- bzw. HDAC-Inhibitorstudien implizierten, dass die Acetylierung der Histonproteine im Bereich der *fcc*-Gene essentiell für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters während der Interaktion von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus* ist. Im Gegensatz zu *A. nidulans* aktiviert in *A. fumigatus* GcnE das *fcc*-Cluster jedoch nicht, das vielleicht durch eine andere HAT reguliert wird. Für die Überprüfung dieser Hypothese müssten Deletionsstämme aller HATs in *A. fumigatus* generiert werden.

Das Genom von *A. fumigatus* enthält 44 Proteine mit einer MYST- bzw. GNAT-Domäne, welche typisch für HATs sind (Marmorstein, 2001; Roth *et al.*, 2001). Das Fehlen der Fumicyclin-typischen Gelbfärbung in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* könnte als Indikator für die Identifikation solcher HATs dienen, die an der Regulation der Cluster-Aktivierung beteiligt sind. GcnE ist jedoch an der Regulation der Konidiogenese beteiligt. In *Aspergillus* wird die Konidienbildung über einen zentralen Regulationsweg, bestehend aus BrlA, AbaA und WetaA,

reguliert (Yu *et al.*, 2006). BrlA ist ein C₂H₂-Zinkfinger Transkriptionsfaktor, der die Gene *abaA* und *wetA* aktiviert (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009). BrlA vorgelagert sind die „fluffy“-Gene (*fluG*, *flbA-E*), benannt nach dem flauschigen Phänotyp der Deletionsmutanten in *A. nidulans* (Yu *et al.*, 2006). BrlA wird auf drei parallelen Wegen durch FlbA-E aktiviert, die wiederum durch FluG reguliert werden (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010). So interagiert FlbE mit FlbB, das wiederum für die Expression von *flbD* notwendig ist. Die Aktivierung von *brlA* erfolgt dann kooperativ durch FlbB und FlbD (Garzia *et al.*, 2010). Des Weiteren kann *brlA* noch durch FlbA bzw. FlbC aktiviert werden (Kwon *et al.*, 2010). In *A. fumigatus* führte die Deletion von FlbE zu einer reduzierten Bildung grau-grüner Sporen und einer verzögerten Expression von *brlA* im Vergleich zum Wildtyp (Kwon *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2013). Der *brlA*-Deletionsstamm ist nicht pigmentiert und die Entwicklung der Konidiophore endete mit der Bildung des Stieles (Twumasi-Boateng *et al.*, 2009). Der $\Delta abaA$ -Stamm bildete zylinderförmige Terminal-Zellen (verlängerte Phialiden), jedoch keine Sporen (Tao & Yu, 2011). Wurde das Gen *wetA* in *A. fumigatus* deletiert, wurden miteinander verbundene Konidien gebildet, deren Reifung unvollständig war (Tao & Yu, 2011).

Der $\Delta gcnE$ -Stamm von *A. fumigatus* zeigte einen intermediären Phänotyp. Die Deletionsstämme von $\Delta gcnE$ und $\Delta wetA$ bildeten farblose Sporen. Jedoch konnten im $\Delta gcnE$ -Stamm sowohl Konidiophore mit verlängerten Phialiden und fehlenden Sporen, wie im $\Delta abaA$ -Stamm, als auch an einigen Konidiophoren die unvollständige konidiale Trennung und Reifung, typisch für den $\Delta wetA$ -Stamm, nachgewiesen werden. Diese Daten implizieren, dass GcnE BrlA und dadurch auch AbaA und WetA reguliert und damit ein wichtiger Entwicklungsregulator ist. Dabei wirkt GcnE wahrscheinlich unabhängig von den „fluffy“-Genen. Da der $\Delta flbE$ -Stamm im Gegensatz zum $\Delta gcnE$ -Stamm grüne Sporen bilden konnte, ist GcnE wahrscheinlich nicht an der Regulation der „fluffy“-Gene beteiligt. Diese Vermutung wird unterstützt von Beobachtungen im $\Delta gcnE$ -Stamm von *A. nidulans*. Cánovas *et al.* (2014) konnten zeigen, dass *brlA* ein Hauptziel von GcnE ist. Des Weiteren war die Expression der „fluffy“-Gene im $\Delta gcnE$ -Stamm nicht beeinflusst, diese Gene waren demnach nicht GcnE reguliert (Cánovas *et al.*, 2014). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass GcnE sowohl in *A. nidulans* (Cánovas *et al.*, 2014) als auch in *A. fumigatus* ein wichtiger Regulator der Konidiogenese ist.

2.2 Eisenmangel und die Regulatoren der intrazellulären Eisenkonzentration, SreA und HapX, sind an der Regulation der Fumicyclin-Bildung beteiligt

Ziel dieser Arbeit war es auch, Gene bzw. Proteine zu identifizieren, die einen Einfluss auf die Fumicyclin-Produktion ausüben. Die Gelbfärbung des Kulturüberstandes der Kokultur diente dabei als Indikator der Fumicyclin-Produktion. In Koinkubationen von Stämmen, in denen die Eisen-regulierenden Transkriptionsfaktoren SreA oder HapX deletiert waren ($\Delta sreA$ und $\Delta hapX$), war in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* weiterhin eine Gelbfärbung der Kulturüberstände zu beobachten und die Bildung von Fumicyclinen konnte nachgewiesen werden. Dies war widersprüchlich zum fehlenden Nachweis der Transkription von *fccR* und *fccA* im „Northern blot“. Möglicherweise sind in diesen Stämmen erst zu einem späteren Zeitpunkt größere Mengen an Transkriptionsfaktor- und PKS-Transkripten vorhanden. Wenn die Transkription der *fcc*-Gene in den $\Delta hapX$ - und $\Delta sreA$ -Stämmen verzögert wäre, würde dies auch die geringen Mengen an detektierten Fumicyclinen erklären.

Die Färbung des Kulturüberstandes in den $\Delta hapX$ - und $\Delta sreA$ -Stämmen wurde wahrscheinlich nicht ausschließlich durch Fumicycline hervorgerufen. Unter Eisenmangelbedingungen färbte sich die $\Delta hapX$ -Kultur vermutlich durch die Bildung von Protoporphyrin IX rötlich (Schrettl *et al.*, 2010). Die rötliche Färbung des $\Delta sreA$ -Stammes unter +Fe-Bedingungen wurde zudem wahrscheinlich durch Häm und Ferricrocin hervorgerufen (Schrettl *et al.*, 2008).

HapX und SreA sind nicht essentiell für die Regulation des Fumicyclin-Clusters. Da die gebildeten Fumicyclin-Mengen jedoch nur sehr gering waren und auch praktisch keine Transkripte in der Kokultur der Deletionsstämme mit *S. rapamycinicus* nachweisbar waren, ist dennoch davon auszugehen, dass SreA und HapX an der Signaltransduktion, die zur Aktivierung des Fumicyclin-Clusters führt, beteiligt sind.

Zudem konnte gezeigt werden, dass unter –Fe-Bedingungen MpkA vermehrt phosphoryliert wird und sich die Lokalisation vom Zytosol Richtung Zellkern verschiebt (Jain *et al.*, 2011). Das MpkA an der Regulation des Fumicyclin-Clusters beteiligt ist, konnte ich bereits während meiner Diplomarbeit zeigen (König, 2009). Dass bei geringen Eisenkonzentrationen mehr Fumicycline gebildet wurden, kann durch die Begünstigung der Phosphorylierung und Lokalisation von MpkA im Zellkern erklärt werden.

2.3 Die Phosphorylierung von MpkA ist essentiell für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters während der Interaktion von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus*

MpkA ist eine Mitogen-aktivierte Protein Kinase (MAPK), die durch duale Phosphorylierung aktiviert wird (Chang & Karin, 2001) und in *A. fumigatus* bei Beeinträchtigung der Zellwandintegrität z. B. durch Zugabe von Glasperlen oder von Zellwand-lysierendem Glucanex aktiviert wird (Valiante *et al.*, 2009). Dabei nimmt der Grad der Phosphorylierung mit Einsetzen des Zellwandstresses stetig zu. Bei Kokultivierung von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus* zeigte sich jedoch ein abweichendes Muster. Der Streptomyces verursachte zunächst eine Dephosphorylierung von MpkA, die schon nach wenigen Minuten durch eine wieder ansteigende Phosphorylierung abgelöst wurde. Dieses Deaktivierungs- bzw. Aktivierungsmuster zeigte sich auch, wenn *A. fumigatus* mit dem Echinocandin Caspofungin behandelt wurde (V. Valiante, persönliche Mitteilung). Caspofungin inhibiert Fks1, die katalytische Untereinheit des β -Glucansynthase-Komplexes (Firon *et al.*, 2002; Mouyna *et al.*, 2004; Perlin, 2014). Möglicherweise wurde also während der Interaktion von Pilz und Bakterium Fks1 inhibiert, was sich dann auf die Phosphorylierung von MpkA auswirkte und zur Aktivierung des Fumicyclin-Clusters führte. Auch wenn während der Interaktion von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* zunächst eine Dephosphorylierung und somit eine Deaktivierung von MpkA erfolgte, ist die nachfolgende Phosphorylierung der essentielle Schritt, der zur Aktivierung des Fumicyclin-Clusters führte. Dies konnte mit den Stämmen *mpkA*-Y188F, *mpkA*-T186A und *mpkA*-TY186/188AF belegt werden, in denen Aminosäuren an den Positionen 186 und/oder 188 von MpkA ausgetauscht worden waren und die Phosphorylierung von MpkA nur noch teilweise bzw. gar nicht mehr möglich war. Die Ergebnisse weisen nach, dass MpkA im phosphorylierten Zustand vorliegen muss, um eine Aktivierung des *fcc*-Clusters zu gewährleisten. Wiederum waren nicht beide Phosphorylierungsstellen von gleicher Bedeutung. Wurde Tyrosin188 durch Phenylalanin substituiert, war für manche *fcc*-Gene im Vergleich zum Wildtyp eine geringere Transkriptmenge nachweisbar, auch der Gelbton der Schüttelkultur war etwas blasser. Wenn jedoch Threonin186 durch Alanin ersetzt wurde, sank die Transkription im Vergleich zum Wildtyp und zur *mpkA*-Y188F-Mutante erheblich. Die Gelbfärbung des Kulturüberstandes blieb aus. Die Transkription der *fcc*-Gene sowie die Fumicyclin-Produktion korrelierte demzufolge mit der Phosphorylierung von Threonin186 von MpkA.

Die Aktivierung von MpkA während der Interaktion könnte daraufhin deuten, dass *S. rapamycinicus* die Zellwandintegrität von *A. fumigatus* beeinträchtigt. Dies könnte auf zellwanddegradierende Enzyme zurückgeführt werden. Dass Streptomycceten die Fähigkeit besitzen, Zellwände von Pilzen zu zersetzen und lytische Enzyme wie Chitinasen, α - und β -Glucanasen zu sekretieren, konnte bereits gezeigt werden (Takehara *et al.*, 1981; Prapagdee *et al.*, 2008; Fróes *et al.*, 2012). Welche Zellwandbestandteile *S. rapamycinicus* degradieren kann, ist nicht bekannt.

Es konnte gezeigt werden, dass im Wildtyp auch ohne *S. rapamycinicus* die *fcc*-Gene transkribiert wurden, wenn dem Medium der HDAC-Inhibitor SAHA zugesetzt wurde. Im $\Delta mpkA$ -Stamm führte die Zugabe von SAHA oder *S. rapamycinicus* jedoch nicht zur Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters. Nur wenn sowohl SAHA als auch der Streptomyccet zugegeben wurden, waren Transkripte der *fcc*-Gene nachweisbar. Das Unterdrücken der Deacetylierung durch Zugabe von SAHA reichte im $\Delta mpkA$ -Stamm im Gegensatz zum Wildtyp nicht für die *fcc*-Transkriptionsaktivierung aus. Daher ist anzunehmen, dass es sich bei einem Zielprotein von MpkA, das für die Aktivierung der *fcc*-Transkription benötigt wird, um eine HAT handeln könnte. Wäre eine HDAC das Zielprotein von MpkA, müsste SAHA den Effekt der *mpkA*-Deletion kompensieren können.

Die geringen Mengen *fcc*-Transkripte im $\Delta mpkA$ -Stamm bei Kokultivierung mit *S. rapamycinicus* konnten durch AMM mit 0,6 M KCl gesteigert werden. Die stabilisierende Wirkung von Osmoregulatoren wie KCl und Sorbitol auf wachstumsdefiziente Mutanten wurde für andere Organismen sowie *A. fumigatus* bereits nachgewiesen (Kraus *et al.*, 2003; Tüncher *et al.*, 2004; Korolyev *et al.*, 2005). Eine Komplementation des Phänotyps (reduziertes radiales Wachstum, verringerte Sporulation, erhöhte Sensitivität bei Zellwandstress) durch Verwendung von KCl und Sorbitol war im $\Delta mpkA$ -Stamm von *A. fumigatus* jedoch nicht möglich (Valiante *et al.*, 2008; Valiante *et al.*, 2009). Die Umsetzung der osmoregulatorischen Wirkung von KCl auf molekularbiologischer Ebene ist kaum erforscht. Für *A. nidulans* konnte gezeigt werden, dass die Supplementierung des Mediums mit 0,6 M KCl keinen Einfluss auf die Zusammensetzung oder die Dicke der Zellwand hatte. Jedoch verringerte sich deren Festigkeit (Zhao *et al.*, 2005). Der Wechsel vom AMM der Vorkultur zu AMM mit 0,6 M KCl während der Hauptkultur entspricht einem Wechsel von einer hypotonen zu einer hypertonen Lösung. Daraus resultiert ein hyperosmotischer Schock und die Aktivierung des HOG-

Signalweges in *A. nidulans* (Han & Prade, 2002) und *A. fumigatus* (V. Valiante, persönliche Mitteilung). Die MAP-Kinasen des HOG-Signalweges, SakA und MpkC, sind jedoch nicht essentiell für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters (König, 2009). Die Deletionen von *sakA* bzw. *mpkC* hatten keinen Einfluss auf die Transkription von *fccA* und *fccR* (König, 2009). Über welchen Mechanismus KCl molekular auf die Transkription der *fcc*-Gene im $\Delta mpkA$ -Stamm einwirkt, konnte nicht geklärt werden.

Für die Interaktion von *S. rapamycinicus* mit dem *A. nidulans* $\Delta mpkA$ -Stamm ($An\Delta mpkA$) konnte gezeigt werden, dass die Transkription von *orsA* (kodiert für die PKS der Biosynthese von Lecanor- und Orsellinsäure) im Vergleich zum Wildtyp stark herunter reguliert war. Dieser Effekt konnte durch die Zugabe von 0,6 M KCl zum Medium aufgehoben werden. Damit zeigten sowohl der *A. fumigatus* $\Delta mpkA$ - als auch der $An\Delta mpkA$ -Stamm in der Kokultur mit *S. rapamycinicus* ohne bzw. mit 0,6 M KCl ein identisches Verhalten in Bezug auf die Transkriptmengen der während der Interaktion aktivierten Sekundärmetabolit-Gencluster. Die vorgelegten Daten unterstützen die Vermutung, dass MpkA nicht nur in die Aktivierung des *fcc*-Clusters in *A. fumigatus*, sondern auch in die Aktivierung des *ors*-Clusters in *A. nidulans* involviert ist. Die Regulation der Biosynthesen der Fumicycline (in *A. fumigatus*) sowie Lecanor- und Orsellinsäure (in *A. nidulans*) sind also teilweise analog. Für beide Interaktionen konnte gezeigt werden, dass neben der Acetylierung von Histonproteinen, in *A. fumigatus* durch eine bisher nicht identifizierte HAT und in *A. nidulans* durch GcnE (Nützmann *et al.*, 2011), sowie MpkA essentielle Faktoren der Signalweiterleitung zur Aktivierung des *fcc*- bzw. *ors*-Clusters sind.

2.4 α -Glucan als Bestandteil der Zellwand ist für die Aktivierung des Fumicyclin-Clusters notwendig

Die Zellwand der Hyphen in *A. fumigatus* besteht zu ca. 40 % aus dem Polysaccharid $\alpha(1-3)$ -Glucan (Maubon *et al.*, 2006). Für die Synthese sind drei membran-ständige Enzyme, die $\alpha(1-3)$ -Glucansynthasen Ags1, Ags2 und Ags3, verantwortlich (Maubon *et al.*, 2006). Die Deletion aller korrespondierenden Gene ($\Delta ags1/2/3$) führte zu einem Stamm, dessen Zellwand kein α -Glucan enthielt (Henry *et al.*, 2012). Der Mangel an α -Glucan hatte keinen Einfluss auf die Auskeimung der Sporen oder das vegetative Wachstum und wurde durch eine vermehrte Bildung von β -Glucanen und Chitin ausgeglichen (Henry *et al.*, 2012). In der Kokultur des

$\Delta ags1/2/3$ -Stammes mit *S. rapamycinicus* waren jedoch kaum Transkripte des Transkriptionsfaktorgens *fccR* und der PKS *fccA* nachweisbar.

β -Glucan ist stärker verzweigt als α -Glucan und bildet Quervernetzungen zu Chitin aus (Abad *et al.*, 2010). Die Vermutung liegt nahe, dass deshalb die Festigkeit der Zellwand in der $\Delta ags1/2/3$ -Mutante erhöht ist. Dies könnte die Interaktion mit *S. rapamycinicus* beeinflussen. Das Einschleusen von Substanzen z. B. mit HDAC-inhibitorischer Wirkung wäre wahrscheinlich erschwert. α -Glucan ist zudem das Hauptadhesiv bei der Ausbildung von Biofilmen und Agglomeration auskeimender Sporen in *A. fumigatus* (Beauvais *et al.*, 2007; Fontaine *et al.*, 2010). Somit könnte das Fehlen dieses Zellwandbestandteils die Anheftung des Streptomyceten an *A. fumigatus* während der Interaktion schwächen bzw. verhindern. α -Glucane sind zudem wichtige Faktoren für die Virulenz medizinisch relevanter Pilze (Hogan & Klein, 1994; Rappleye *et al.*, 2004). In der Hefe *Histoplasma capsulatum* maskiert α -Glucan immunogene Moleküle, wie β -Glucan vor dem Dectin-1-Rezeptor (Rappleye *et al.*, 2007). Hefe-Zellen, denen α -Glucan fehlte, wurden vom Immunsystem schneller erkannt. Dies demonstriert die enormen strukturellen Veränderungen der Zellwand in α -Glucan-defizienten Stämmen. Im Umkehrschluss könnte dies für die Interaktion von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus* auch bedeuten, dass für die Signalweiterleitung wichtige Faktoren wie z. B. Rezeptoren nicht mehr oder in veränderter Weise präsentiert werden und deshalb keine Signaltransduktion stattfinden kann.

Es konnte gezeigt werden, dass durch die Lyase-Aktivität des Pflanzenpathogens *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* während der Infektion Oligogalakturonide aus der Zellwand von *Capsicum annuum* freigesetzt werden und eine Immunabwehr der Pflanze hervorrufen (Vorhölter *et al.*, 2012). Möglicherweise degradierte *S. rapamycinicus* während der Interaktion die Zellwand von *A. fumigatus* und setzte α -Glucane frei. *A. fumigatus* könnte diese Zellwandschädigung z. B. über Rezeptoren wahrgenommen haben. α -Glucane könnten daher als Signalmoleküle fungiert haben, die z. B. durch Aktivierung von MpkA auch zur Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters führten. Im $\Delta ags1/2/3$ -Stamm würden während der Interaktion mit *S. rapamycinicus* keine α -Glucane freigesetzt werden. Dies würde auch erklären, warum im $\Delta ags1/2/3$ -Stamm die Transkription des Regulatorgens *fccR* und der PKS-Gens *fccA* eingeschränkt war.

Enthielt das AMM der Kokultur des $\Delta ags1/2/3$ -Stammes mit *S. rapamycinicus* 0,6 M KCl, konnte dadurch die gebildete Transkriptmenge der Gene *fccR* und *fccA*, wie schon im $\Delta mpkA$ -Stamm beobachtet, gesteigert werden. Es konnte gezeigt werden, dass KCl im Medium die Festigkeit der Zellwand von *A. nidulans* verringert (Zhao *et al.*, 2005). Sollte die Zellwandfestigkeit des $\Delta ags1/2/3$ -Stammes durch die zusätzlichen Vernetzungen von β -Glucan und Chitin wirklich erhöht sein, könnte KCl im Medium dem entgegenwirken und dadurch die Bildung der *fcc*-Transkripte begünstigen. Zudem ist ein ähnlicher molekularer Wirkmechanismus von KCl sowohl in der $\Delta mpkA$ - als auch in der $\Delta ags1/2/3$ -Mutante denkbar. Da dieser aber nicht bekannt ist, kann dies nur spekuliert werden.

3 Fumicycline sind keine Virulenzdeterminanten

In *Burkholderia pseudomallei* ist die Bildung von Sekundärmetaboliten, Malleipeptine (Biofilmmodulator) sowie Syrbactin-ähnliche Proteasom-Inhibitoren, unverzichtbar für die Virulenz (Biggins *et al.*, 2014). Das von *A. fumigatus* produzierte Epipolythiodioxopiperazin (ETP)-Toxin Gliotoxin ist in einem Tierversuch mit immunsupprimierten Mäusen nicht erforderlich für die Pathogenität gewesen (Kupfahl *et al.*, 2006), übte jedoch in geringen Konzentrationen toxische Effekte auf phagozytische Zellen und T-Lymphozyten *in vitro* aus und könnte somit Abwehrmechanismen des Wirtes während des Infektionsprozesses beeinträchtigen (Hof & Kupfahl, 2009). Die physiologische Funktion der Fumicycline ist hingegen nicht bekannt. Jedoch sind Transkripte des Regulatorgens *fccR* und der PKS *fccA* bei der Infektion von Mäusen mit *A. fumigatus* nachweisbar (McDonagh *et al.*, 2008). Neosartoricin, das Produkt des zum Fumicyclin-Cluster homologen Sekundärmetabolit-Genclusters von *N. fischeri*, inhibierte T-Zellen ($IC_{50} = 3 \mu M$) (Chooi *et al.*, 2013). Da sich Fumicycline und Neosartoricin strukturell sehr ähneln, kann von einer analogen Wirkung der Metabolite ausgegangen werden. Die Sterblichkeitsrate der Versuchstiere, die mit dem $\Delta fccA$ -Stamm infiziert wurden, war im durchgeführten Mausinfektionsversuch im Vergleich zum Wildtyp unverändert. Es ist daher davon auszugehen, dass Fumicycline keinen signifikanten Einfluss auf den Infektionsverlauf haben und keine Virulenzdeterminanten darstellen, aber möglicherweise wie für Gliotoxin vermutet, die Abwehr des Wirtes stören.

4 Identifizierung zum Fumicyclin-Cluster homologer Sekundärmetabolit-Gencluster in Pilzen

Es wurde eine Ähnlichkeits-Analyse des Fumicyclin-Clusters durchgeführt, um herauszufinden, ob es spezifisch für *A. fumigatus* ist oder sich homologe Cluster auch in anderen Pilzen nachweisen lassen. Dabei konnten Cluster sowohl in anderen *Aspergilli* als auch in einigen Dermatophyten identifiziert werden, die in ihrer Nukleotid- und/oder Protein-Sequenz Ähnlichkeiten zum Fumicyclin-Cluster aufweisen. Dabei war die Ähnlichkeit der homologen Gene und Proteine in *N. fischeri* am größten. Dies lässt sich auf die nahe taxonomische Verwandtschaft von *A. fumigatus* und *N. fischeri* zurückführen (Peterson, 2008). Spezies der Gruppe der Dermatophyten mit Sekundärmetabolit-Genclustern homolog zum Fumicyclin-Cluster sind zoophil (*A. otae*, *A. benhamiae*, *T. verrucosum*) bzw. antrophil (*T. rubrum*, *T. tonsurans*, *T. equinum*) (Gräser *et al.*, 1999). Es ist nicht bekannt, unter welchen Bedingungen die homologen Substanzen der Dermatophyten produziert werden und welche Funktion sie erfüllen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Cluster funktionsfähig sind (Yin *et al.*, 2013). Durch heterologe Expression in *A. nidulans* konnte die Produktion einer gelblichen Substanz, ähnlichem dem Neosartoricin, nachgewiesen werden (Yin *et al.*, 2013). Es ist daher anzunehmen, dass der Erhalt der Sekundärmetabolit-Gencluster und ihrer Produkte den Dermatophyten einen Vorteil verschaffen (Walton, 2000). Die PKS AptA, die Hydrolase AptB und Monooxygenase AptC des Asperthecin-Clusters in *A. nidulans* sind zu mindestens 60 % identisch mit FccA (PKS), FccB (M β L-TE) bzw. FccC (Monooxygenase) des Fumicyclin-Clusters in *A. fumigatus*. Asperthecin ist ein trizyklische Molekül mit einem Anthron-ähnlichen Grundgerüst (Szewczyk *et al.*, 2008). Eine sehr ähnliche Ringstruktur, mit einem Anthracenon-Grundgerüst, weisen auch die Fumicycline auf. Drei der vier Biosyntheseenzyme für ein Naphtacendion in *A. niger* sind homolog zur PKS, M β L-TE bzw. FAD-abhängigen Monooxygenase des Fumicyclin-Clusters (Abbildung 43). In *Penicillium aethiopicum* konnten vier Proteine homolog zu Enzymen des *fcc*-Clusters identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Thioesterase VrtG, die FAD-abhängige Oxidoreduktase VrtH, die PKS VrtA und die Prenyltransferase VrtC. Das Cluster in *Penicillium aethiopicum* kodiert für den Sekundärmetaboliten Viridicatumtoxin und umfasst 12 Biosynthese- und zwei Transkriptionsfaktorgene (Chooi *et al.*, 2010). Die Zahl der in den Clustern kodierten Gene

spiegelt die Größe und Komplexität der Sekundärmetabolite (Asperthecin, Naphtacendion, Fumicyclin, Neosartoricin und Viridicatumtoxin) wider (Abbildung 43).

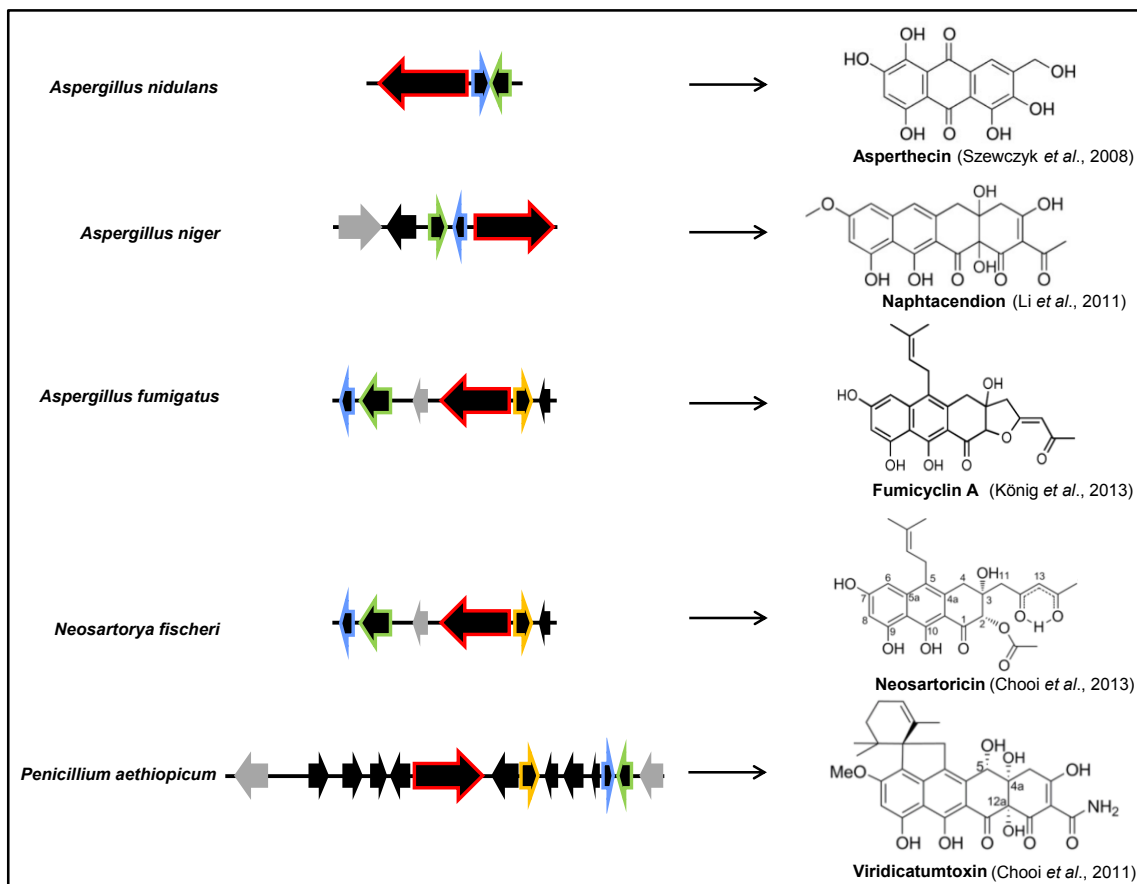


Abbildung 43: Clusteraufbau und Struktur von Fumicyclin und Homologen

Aufgeführt ist die Struktur von Fumicyclin A und der Aufbau des *fcc*-Clusters sowie deren Homologen in *A. nidulans*, *A. niger*, *N. fischeri* und *P. aethiopicum*. In *A. nidulans* kodieren drei Gene für die Biosynthese von Asperthecin, in *A. niger* vier Gene für die Biosynthese eines Naphtacendions (+ einem Regulatorgen). In *A. fumigatus* und *N. fischeri* kodieren fünf Gene für Fumicyclin A bzw. Neosartoricin (+ jeweils einem Regulatorgen). Viridicatumtoxin wird durch 12 Biosynthesegene (+ zwei Regulatorgene) in *P. aethiopicum* kodiert. Die Größe der Cluster und die Anzahl der kodierten Enzyme spiegeln sich in der Komplexität der Naturstoffe wider. **Homologe Biosynthesegene (Pfeil-Rahmen): rot – PKS; blau – MβL-TE; grün – FAD-abhängige Monooxygenase; orange – Prenyltransferase, graue Pfeile: Regulatorgene**

Die Organisation der Synthesegene von Sekundärmetaboliten in Clustern ist typisch für Pilze (Smith *et al.*, 1990; Brown *et al.*, 1996; Walton, 2000; Perrin *et al.*, 2007). Allgemein ist das Vorkommen aller für einen Synthese-Prozess benötigten Gene an einem Ort im Genom aber untypisch für Eukaryoten. So sind die Gene für wichtige Prozesse, wie dem Citratzyklus und der Glukoneogenese, über das gesamte Genom verteilt (Walton, 2000). Eine Theorie für die Entstehung von Sekundärmetabolit-Genclustern in Pilzen ist der horizontale Gentransfer

(HGT) aus Prokaryoten (Keeling, 2009; Marcet-Houben & Gabaldon, 2010). Es ist jedoch nicht anzunehmen, dass das Fumicyclin-Cluster durch HGT aus einem bakteriellen Vorfahren entstanden ist. Die fungalen Clustergene enthalten Intronen. Zudem lässt ihre Orientierung im Genom auf das Vorhandensein mehrerer Promotoren schließen. Typisch für bakterielle Cluster, auch als Operonen bezeichnet, sind jedoch polyzistronische mRNAs (Jacob *et al.*, 1960; Walton, 2000). Außerdem konnten mit der Ähnlichkeits-Analyse keine Bakterien mit Genen bzw. Proteinen homolog zum Fumicyclin-Cluster identifiziert werden.

Das Fumicyclin-Cluster und seine Homologen entstanden möglicherweise ähnlich den Epipolythiodioxopiperazin (ETP)- Genclustern in Ascomyceten (Patron *et al.*, 2007). Demnach besitzen das Fumicyclin-Cluster und die homologen Cluster der in der Ähnlichkeits-Analyse ermittelten Pilz-Arten einen gemeinsamen Ursprung. Die Gene bzw. Proteine für die PKS, M β L-TE und die Monooxygenase sind in allen Spezies mit Homologen zum *fcc*-Cluster am stärksten konserviert und konnten in allen homologen Genclustern identifiziert werden. Es ist daher anzunehmen, dass diese Gene/Proteine bereits im gemeinsamen Vorfahren enthalten waren. Diese Theorie wird zumindest teilweise durch die identische Anordnung und Orientierung der Gene des Asperthecin- und des Naphtacendion-Clusters belegt. Die Gene des Ur-Clusters wurden möglicherweise aus bereits im Genom vorhandenen Genen z. B. durch Duplizierung rekrutiert (Patron *et al.*, 2007). Dies wird vermutet, da viele Clustergene Reaktionen katalysieren, die auch bei anderen Prozessen der Zelle vorkommen (Patron *et al.*, 2007). Anschließend führte HGT zwischen verschiedenen Pilz-Spezies zur ungleichmäßigen Verteilung des entstandenen Clusters (Patron *et al.*, 2007; Khaldi *et al.*, 2008). Die unterschiedliche Anzahl der Gene in den jeweiligen Spezies ist auf Genduplikation bzw. –verlust sowie auf weitere Spezialisierung von Genen zurückzuführen (Patron *et al.*, 2007; Khaldi *et al.*, 2008). Genverlust würde auch das Fehlen eines Regulorgens im Asperthecin-Cluster von *A. nidulans* im Gegensatz zu den anderen homologen Clustern erklären.

5 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war die Aufklärung der Signaltransduktion, die zur Aktivierung des Fumicyclin-Genclusters und der Fumicyclin-Produktion führte, sowie die Charakterisierung der Biosynthesegene. Das Fehlen von Intermediaten der Fumicycline in den Deletionsstämmen der Gene von *fccC* und *fccD* verhinderte eine vollständige Aufklärung der Fumicyclin-Biosynthese. Jedoch konnte gezeigt werden, dass FccR der Regulator der

Transkription der *fcc*-Gene und der Fumicyclin-Biosynthese ist und dass FccB wahrscheinlich die Abspaltung des Polyketids von der PKS FccA katalysiert. Durch den Vergleich mit Biosynthesen von zu Fumicyclin homologen Sekundärmetaboliten und der Domänenstruktur der Biosyntheseenzyme kann angenommen werden, dass FccD die Prenylierung und FccC die Hydroxylierung von Fumicyclin-Zwischenprodukten katalysieren. Die vorgelegten Daten zeigten, dass für die Transkription der *fcc*-Gene die Phosphorylierung der MAP-Kinase MpkA am Threonin186 essentiell war. MpkA ist ein Regulator der Zellwandintegrität. Die Phosphorylierung von MpkA während der Kokultivierung von *A. fumigatus* mit *S. rapamycinicus*, lässt den Schluss zu, dass der Streptomyces die Zellwandintegrität des Pilzes, z. B. durch Degradation von Zellwandbestandteilen beeinflusst. In Deletionsstämmen von Regulatoren des Eisengehaltes der Zelle (Δ sreA und Δ hapX) waren kaum Transkripte des PKS- bzw. des Transkriptionsfaktorgens (*fccA* bzw. *fccR*) nachweisbar. Dadurch konnte gezeigt werden, dass diese Transkriptionsfaktoren ebenfalls an der Regulation des Fumicyclin-Genclusters beteiligt waren. Durch HAT- und HDAC-Inhibitionsstudien konnte gezeigt werden, dass die Aktivität des Fumicyclin-Genclusters durch Histon-modifizierende Enzyme reguliert wurde, deren Aktivität wiederum MpkA-reguliert sein könnte und dass der Streptomyces während der Interaktion möglicherweise Substanzen mit SAHA-ähnlicher Wirkung in *A. fumigatus* einschleust. Die erhöhte Fumicyclin-Produktion im Überexpressionsstamm durch Zugabe des Streptomycesen sowie die Beobachtung, dass SAHA im Wildtyp zwar die Transkription der *fcc*-Gene, aber nicht die Fumicyclin-Produktion induzierte, lässt vermuten, dass posttranslationale Modifikationen wichtig für die Fumicyclin-Biosynthese sind. Im Δ ags1/2/3-Stamm, in dem die Zellwand kein α -Glucan enthält, wurden die *fcc*-Gene ebenfalls kaum transkribiert. Die Rolle von Zellwandkomponenten während der *A. fumigatus* – *S. rapamycinicus* Interaktion könnte sowohl in der Präsentation bzw. der Zugänglichkeit von Rezeptoren liegen, die die externen Signale des Streptomycesen ins Zellinnere weiterleiten, als auch in der Befähigung des Streptomycesen, sich an *A. fumigatus* zu heften oder Signalmoleküle, z. B. degradiertes α -Glucan, zu bilden.

In Abbildung 44 ist eine Zusammenfassung der Daten und des sich daraus ergebenden Signaltransduktionsweges der Fumicyclin-Cluster-Aktivierung dargestellt.

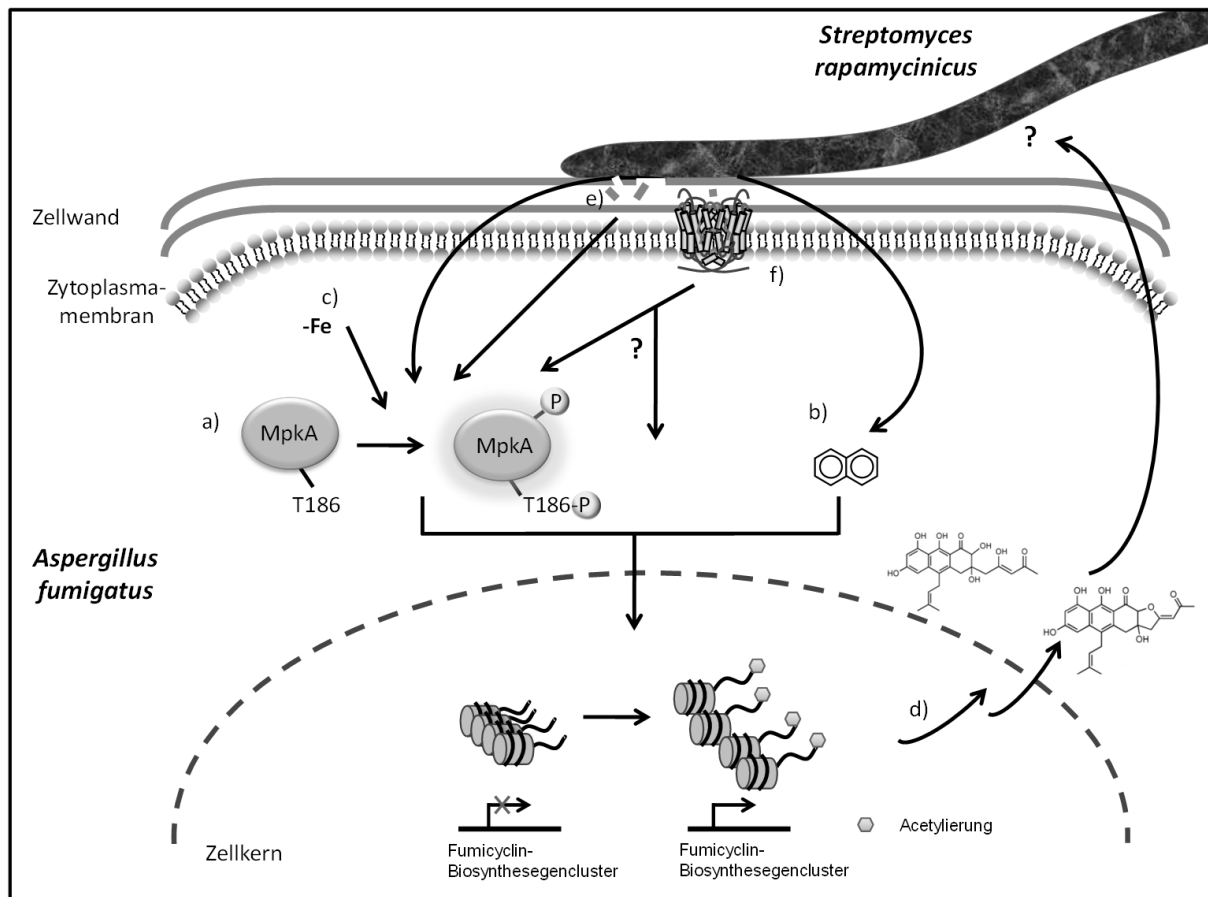


Abbildung 44: Modell der Fumicyclin-Cluster-Aktivierung in *A. fumigatus* bei Kokultivierung mit *S. rapamycinicus*

Während der Interaktion von *A. fumigatus* und *S. rapamycinicus* kommt es zur Aktivierung von **a)** MpkA durch Phosphorylierung (an Threonin186 und Tyrosin188) und zur erhöhten Acetylierung der Histone im Bereich des *fcc*-Locus möglicherweise durch **b)** Einschleusung von Substanzen mit HDAC-inhibitorischer Wirkung. Die Bildung der Fumicycline ist dabei abhängig von **c)** der Eisenkonzentration im Medium, sowie möglicherweise **d)** von posttranslationalen Modifikationen der Biosyntheseeenzyme. Komponenten der Zellwand spielen wahrscheinlich eine Rolle bei der Aktivierung des *fcc*-Genclusters durch Präsentation von Rezeptoren, die die externen Signale des Streptomyceten ins Zellinnere weiterleiten, oder sie aktivieren MpkA bei Zellwandschäden verursacht durch *S. rapamycinicus*. Bestandteile der Zellwand (**e**) könnten dabei selbst an Rezeptoren (**f**) binden und zur Aktivierung von MpkA führen.

Literaturverzeichnis

- Abad, A., Fernandez-Molina, J. V., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J. & other authors (2010).** What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Revista iberoamericana de micologia* 27, 155-182.
- Abe, K., Gomi, K., Hasegawa, F. & Machida, M. (2006).** Impact of *Aspergillus oryzae* genomics on industrial production of metabolites. *Mycopathologia* 162, 143-153.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. & Lipman, D. J. (1990).** Basic local alignment search tool. *Journal of molecular biology* 215, 403-410.
- Andriole, V. T. (1993).** Infections with *Aspergillus species*. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 17 Suppl 2, S481-486.
- Atoui, A., Bao, D., Kaur, N., Grayburn, W. S. & Calvo, A. M. (2008).** *Aspergillus nidulans* natural product biosynthesis is regulated by *mpkB*, a putative pheromone response mitogen-activated protein kinase. *Applied and environmental microbiology* 74, 3596-3600.
- Awakawa, T., Yokota, K., Funa, N., Doi, F., Mori, N., Watanabe, H. & Horinouchi, S. (2009).** Physically discrete beta-lactamase-type thioesterase catalyzes product release in atrochrysone synthesis by iterative type I polyketide synthase. *Chemistry & biology* 16, 613-623.
- Balasubramanyam, K., Swaminathan, V., Ranganathan, A. & Kundu, T. K. (2003).** Small molecule modulators of histone acetyltransferase p300. *The Journal of biological chemistry* 278, 19134-19140.
- Ballance, D. J. & Turner, G. (1985).** Development of a high-frequency transforming vector for *Aspergillus nidulans*. *Gene* 36, 321-331.
- Balloy, V. & Chignard, M. (2009).** The innate immune response to *Aspergillus fumigatus*. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 11, 919-927.
- Baranasic, D., Gacesa, R., Starcevic, A., Zucko, J., Blazic, M. & other authors (2013).** Draft Genome Sequence of *Streptomyces rapamycinicus* Strain NRRL 5491, the Producer of the Immunosuppressant Rapamycin. *Genome announcements* 1.
- Bardwell, L. (2004).** A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 25, 1465-1476.
- Beauvais, A., Schmidt, C., Guadagnini, S., Roux, P., Perret, E. & other authors (2007).** An extracellular matrix glues together the aerial-grown hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *Cellular microbiology* 9, 1588-1600.

- Beffa, T., Staib, F., Lott Fischer, J., Lyon, P. F., Gumowski, P. & other authors (1998).** Mycological control and surveillance of biological waste and compost. *Medical mycology* 36 Suppl 1, 137-145.
- Behnsen, J., Lessing, F., Schindler, S., Wartenberg, D., Jacobsen, I. D., Thoen, M., Zipfel, P. F. & Brakhage, A. A. (2010).** Secreted *Aspergillus fumigatus* protease Alp1 degrades human complement proteins C3, C4, and C5. *Infection and immunity* 78, 3585-3594.
- Benoit, I., van den Esker, M. H., Patyshakuliyeva, A., Mattern, D. J., Blei, F. & other authors (2014).** *Bacillus subtilis* attachment to *Aspergillus niger* hyphae results in mutually altered metabolism. *Environmental microbiology*.
- Bergmann, S., Schumann, J., Scherlach, K., Lange, C., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2007).** Genomics-driven discovery of PKS-NRPS hybrid metabolites from *Aspergillus nidulans*. *Nature chemical biology* 3, 213-217.
- Bergmann, S., Funk, A. N., Scherlach, K., Schroeckh, V., Shelest, E., Horn, U., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. (2010).** Activation of a silent fungal polyketide biosynthesis pathway through regulatory cross talk with a cryptic nonribosomal peptide synthetase gene cluster. *Applied and environmental microbiology* 76, 8143-8149.
- Bernstein, B. E., Tong, J. K. & Schreiber, S. L. (2000).** Genomewide studies of histone deacetylase function in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 13708-13713.
- Bertrand, S., Bohni, N., Schnee, S., Schumpp, O., Gindro, K. & Wolfender, J. L. (2014).** Metabolite induction via microorganism co-culture: A potential way to enhance chemical diversity for drug discovery. *Biotechnology advances* 32, 1180-1204.
- Biggins, J. B., Kang, H. S., Ternei, M. A., DeShazer, D. & Brady, S. F. (2014).** The chemical arsenal of *Burkholderia pseudomallei* is essential for pathogenicity. *Journal of the American Chemical Society* 136, 9484-9490.
- Bodey, G. P. & Vartivarian, S. (1989).** Aspergillosis. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases* : official publication of the European Society of Clinical Microbiology 8, 413-437.
- Bok, J. W. & Keller, N. P. (2004).** LaeA, a regulator of secondary metabolism in *Aspergillus spp.* *Eukaryotic cell* 3, 527-535.
- Botta, B., Vitali, A., Menendez, P., Misiti, D. & Delle Monache, G. (2005).** Prenylated flavonoids: pharmacology and biotechnology. *Current medicinal chemistry* 12, 717-739.
- Brakhage, A. A. & Langfelder, K. (2002).** Menacing mold: the molecular biology of *Aspergillus fumigatus*. *Annual review of microbiology* 56, 433-455.

Brakhage, A. A. & Schroeckh, V. (2011). Fungal secondary metabolites - strategies to activate silent gene clusters. *Fungal genetics and biology* : FG & B 48, 15-22.

Brown, D. W., Yu, J. H., Kelkar, H. S., Fernandes, M., Nesbitt, T. C., Keller, N. P., Adams, T. H. & Leonard, T. J. (1996). Twenty-five coregulated transcripts define a sterigmatocystin gene cluster in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 1418-1422.

Calvo, A. M., Wilson, R. A., Bok, J. W. & Keller, N. P. (2002). Relationship between secondary metabolism and fungal development. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 66, 447-459, table of contents.

Candau, R., Moore, P. A., Wang, L., Barlev, N., Ying, C. Y., Rosen, C. A. & Berger, S. L. (1996). Identification of human proteins functionally conserved with the yeast putative adaptors ADA2 and GCN5. *Molecular and cellular biology* 16, 593-602.

Cánovas, D., Marcos, A. T., Gacek, A., Ramos, M. S., Gutierrez, G., Reyes-Dominguez, Y. & Strauss, J. (2014). The Histone Acetyltransferase GcnE (GCN5) Plays a Central Role in the Regulation of *Aspergillus* Asexual Development. *Genetics* 197, 1175-1189.

Cantu, D. C., Chen, Y. & Reilly, P. J. (2010). Thioesterases: a new perspective based on their primary and tertiary structures. *Protein science* : a publication of the Protein Society 19, 1281-1295.

Cantu, D. C., Chen, Y., Lemons, M. L. & Reilly, P. J. (2011). ThYme: a database for thioester-active enzymes. *Nucleic acids research* 39, D342-346.

Carfi, A., Pares, S., Duee, E., Galleni, M., Duez, C., Frere, J. M. & Dideberg, O. (1995). The 3-D structure of a zinc metallo-beta-lactamase from *Bacillus cereus* reveals a new type of protein fold. *The EMBO journal* 14, 4914-4921.

Chang, L. & Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37-40.

Chen, J. K., Shen, C. R. & Liu, C. L. (2010). N-acetylglucosamine: production and applications. *Marine drugs* 8, 2493-2516.

Chen, J. W., Luo, Y. L., Hwang, M. J., Peng, F. C. & Ling, K. H. (1999). Territrein B, a tremorgenic mycotoxin that inhibits acetylcholinesterase with a noncovalent yet irreversible binding mechanism. *The Journal of biological chemistry* 274, 34916-34923.

Chi, W. J., Lee, S. Y. & Lee, J. (2011). Functional analysis of SGR4635-induced enhancement of pigmented antibiotic production in *Streptomyces lividans*. *Journal of microbiology* 49, 828-833.

Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Keller, N., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2009). A gene cluster containing two fungal polyketide synthases encodes the biosynthetic pathway

for a polyketide, asperfuranone, in *Aspergillus nidulans*. Journal of the American Chemical Society 131, 2965-2970.

Chiang, Y. M., Szewczyk, E., Davidson, A. D., Entwistle, R., Keller, N. P., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2010). Characterization of the *Aspergillus nidulans* monodictyphenone gene cluster. Applied and environmental microbiology 76, 2067-2074.

Chooi, Y. H., Cacho, R. & Tang, Y. (2010). Identification of the viridicatumtoxin and griseofulvin gene clusters from *Penicillium aethiopicum*. Chemistry & biology 17, 483-494.

Chooi, Y. H., Fang, J., Liu, H., Filler, S. G., Wang, P. & Tang, Y. (2013). Genome mining of a prenylated and immunosuppressive polyketide from pathogenic fungi. Organic letters 15, 780-783.

Christie, P. J. & Cascales, E. (2005). Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). Molecular membrane biology 22, 51-61.

Craney, A., Ahmed, S. & Nodwell, J. (2013). Towards a new science of secondary metabolism. The Journal of antibiotics 66, 387-400.

Crawford, J. M., Vagstad, A. L., Ehrlich, K. C. & Townsend, C. A. (2008). Starter unit specificity directs genome mining of polyketide synthase pathways in fungi. Bioorganic chemistry 36, 16-22.

Cueto, M., Jensen, P. R., Kauffman, C., Fenical, W., Lobkovsky, E. & Clardy, J. (2001). Pestalone, a new antibiotic produced by a marine fungus in response to bacterial challenge. Journal of natural products 64, 1444-1446.

d'Enfert, C. (1996). Selection of multiple disruption events in *Aspergillus fumigatus* using the orotidine-5'-decarboxylase gene, *pyrG*, as a unique transformation marker. Current genetics 30, 76-82.

da Silva Ferreira, M. E., Kress, M. R., Savoldi, M., Goldman, M. H., Hartl, A., Heinekamp, T., Brakhage, A. A. & Goldman, G. H. (2006). The *akuB*(KU80) mutant deficient for nonhomologous end joining is a powerful tool for analyzing pathogenicity in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryotic cell 5, 207-211.

Dhingra, S., Lind, A. L., Lin, H. C., Tang, Y., Rokas, A. & Calvo, A. M. (2013). The fumagillin gene cluster, an example of hundreds of genes under *veA* control in *Aspergillus fumigatus*. PloS one 8, e77147.

Dichtl, K., Ebel, F., Dirr, F., Routier, F. H., Heesemann, J. & Wagener, J. (2010). Farnesol misplaces tip-localized Rho proteins and inhibits cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*. Molecular microbiology 76, 1191-1204.

- Dichtl, K., Helmschrott, C., Dirr, F. & Wagener, J. (2012).** Deciphering cell wall integrity signalling in *Aspergillus fumigatus*: identification and functional characterization of cell wall stress sensors and relevant Rho GTPases. *Molecular microbiology* 83, 506-519.
- Ellis, M. (1999).** Therapy of *Aspergillus fumigatus*-related diseases. *Contributions to microbiology* 2, 105-129.
- Fang, A., Wong, G. K. & Demain, A. L. (2000).** Enhancement of the antifungal activity of rapamycin by the coproduced elaiophyllin and nigericin. *The Journal of antibiotics* 53, 158-162.
- Fedorova, N. D., Khaldi, N., Joardar, V. S., Maiti, R., Amedeo, P. & other authors (2008).** Genomic islands in the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *PLoS genetics* 4, e1000046.
- Fernandes, M., Keller, N. P. & Adams, T. H. (1998).** Sequence-specific binding by *Aspergillus nidulans* AflR, a C6 zinc cluster protein regulating mycotoxin biosynthesis. *Molecular microbiology* 28, 1355-1365.
- Firon, A., Beauvais, A., Latgé, J. P., Couve, E., Grosjean-Cournoyer, M. C. & D'Enfert, C. (2002).** Characterization of essential genes by parasexual genetics in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*: impact of genomic rearrangements associated with electroporation of DNA. *Genetics* 161, 1077-1087.
- Fisch, K. M., Gillaspay, A. F., Gipson, M., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Jackson, L., Najjar, F. Z., Wagele, H. & Cichewicz, R. H. (2009).** Chemical induction of silent biosynthetic pathway transcription in *Aspergillus niger*. *Journal of industrial microbiology & biotechnology* 36, 1199-1213.
- Fontaine, T., Beauvais, A., Loussert, C., Thevenard, B., Fulgsang, C. C., Ohno, N., Clavaud, C., Prevost, M. C. & Latgé, J. P. (2010).** Cell wall alpha1-3glucans induce the aggregation of germinating conidia of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 47, 707-712.
- Frey-Klett, P., Burlinson, P., Deveau, A., Barret, M., Tarkka, M. & Sarniguet, A. (2011).** Bacterial-fungal interactions: hyphens between agricultural, clinical, environmental, and food microbiologists. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 75, 583-609.
- Frisvad, J. C., Rank, C., Nielsen, K. F. & Larsen, T. O. (2009).** Metabolomics of *Aspergillus fumigatus*. *Medical mycology* 47 Suppl 1, S53-71.
- Fróes, A., Macrae, A., Rosa, J., Franco, M., Souza, R., Soares, R. & Coelho, R. (2012).** Selection of a *Streptomyces* strain able to produce cell wall degrading enzymes and active against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of microbiology* 150, 798-806.
- Fujii, I., Watanabe, A., Sankawa, U. & Ebizuka, Y. (2001).** Identification of Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase WA, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chemistry & biology* 8, 189-197.

- Fujii, R., Minami, A., Tsukagoshi, T., Sato, N., Sahara, T., Ohgiya, S., Gomi, K. & Oikawa, H. (2011).** Total biosynthesis of diterpene aphidicolin, a specific inhibitor of DNA polymerase alpha: heterologous expression of four biosynthetic genes in *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 75, 1813-1817.
- Gacek, A. & Strauss, J. (2012).** The chromatin code of fungal secondary metabolite gene clusters. *Applied microbiology and biotechnology* 95, 1389-1404.
- Gardiner, D. M., Waring, P. & Howlett, B. J. (2005).** The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. *Microbiology* 151, 1021-1032.
- Garzia, A., Etxebeste, O., Herrero-Garcia, E., Ugalde, U. & Espeso, E. A. (2010).** The concerted action of bZip and cMyb transcription factors FlbB and FlbD induces *brlA* expression and asexual development in *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 75, 1314-1324.
- Gastebois, A., Clavaud, C., Aïmanianda, V. & Latgé, J. P. (2009).** *Aspergillus fumigatus*: cell wall polysaccharides, their biosynthesis and organization. *Future microbiology* 4, 583-595.
- Gehrke, A., Heinekamp, T., Jacobsen, I. D. & Brakhage, A. A. (2010).** Heptahelical receptors GprC and GprD of *Aspergillus fumigatus* Are essential regulators of colony growth, hyphal morphogenesis, and virulence. *Applied and environmental microbiology* 76, 3989-3998.
- Geiser, D. M., Klich, M. A., Frisvad, J. C., Peterson, S. W., Varga, J. & Samson, R. A. (2007).** The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Studies in mycology* 59, 1-10.
- Gerke, J., Bayram, O., Feussner, K., Landesfeind, M., Shelest, E., Feussner, I. & Braus, G. H. (2012).** Breaking the silence: protein stabilization uncovers silenced biosynthetic gene clusters in the fungus *Aspergillus nidulans*. *Applied and environmental microbiology* 78, 8234-8244.
- Gräser, Y., El Fari, M., Vilgalys, R., Kuijpers, A. F., De Hoog, G. S., Presber, W. & Tietz, H. (1999).** Phylogeny and taxonomy of the family *Arthrodermataceae* (dermatophytes) using sequence analysis of the ribosomal ITS region. *Medical mycology* 37, 105-114.
- Grice, C. M., Bertuzzi, M. & Bignell, E. M. (2013).** Receptor-mediated signaling in *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* 4, 26.
- Haas, H. (2012).** Iron - A Key Nexus in the Virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Frontiers in microbiology* 3, 28.
- Haines, J. (1995).** *Aspergillus* in compost: straw man or fatal flaw. *Biocycle* 36, 32-35.
- Halliwell, B. & Gutteridge, J. M. (1984).** Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *The Biochemical journal* 219, 1-14.

- Hamed, J., Mohammadipanah, F., Klenk, H. P., Potter, G., Schumann, P., Sproer, C., von Jan, M. & Kroppenstedt, R. M. (2010).** *Streptomyces iranensis* sp. nov., isolated from soil. International journal of systematic and evolutionary microbiology 60, 1504-1509.
- Hamon, M. A., Batsche, E., Regnault, B., Tham, T. N., Seveau, S., Muchardt, C. & Cossart, P. (2007).** Histone modifications induced by a family of bacterial toxins. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 13467-13472.
- Han, K. H. & Prade, R. A. (2002).** Osmotic stress-coupled maintenance of polar growth in *Aspergillus nidulans*. Molecular microbiology 43, 1065-1078.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. Journal of molecular biology 166, 557-580.
- Hayes, J. J. & Hansen, J. C. (2001).** Nucleosomes and the chromatin fiber. Current opinion in genetics & development 11, 124-129.
- Hearn, V. M. & Sietsma, J. H. (1994).** Chemical and immunological analysis of the *Aspergillus fumigatus* cell wall. Microbiology 140 (Pt 4), 789-795.
- Henry, C., Latgé, J. P. & Beauvais, A. (2012).** alpha1,3 glucans are dispensable in *Aspergillus fumigatus*. Eukaryotic cell 11, 26-29.
- Hof, H. & Kupfahl, C. (2009).** Gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*: an example that mycotoxins are potential virulence factors. Mycotoxin research 25, 123-131.
- Hogan, D. A., Vik, A. & Kolter, R. (2004).** A *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing molecule influences *Candida albicans* morphology. Molecular microbiology 54, 1212-1223.
- Hogan, L. H. & Klein, B. S. (1994).** Altered expression of surface alpha-1,3-glucan in genetically related strains of *Blastomyces dermatitidis* that differ in virulence. Infection and immunity 62, 3543-3546.
- Honda, N. K., Pavan, F. R., Coelho, R. G., de Andrade Leite, S. R., Micheletti, A. C. & other authors (2010).** Antimycobacterial activity of lichen substances. Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology 17, 328-332.
- Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S. & other authors (2007).** Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex--a novel mechanism of gene regulation by iron. The EMBO journal 26, 3157-3168.
- Inglis, D. O., Binkley, J., Skrzypek, M. S., Arnaud, M. B., Cerqueira, G. C., Shah, P., Wymore, F., Wortman, J. R. & Sherlock, G. (2013).** Comprehensive annotation of secondary metabolite biosynthetic genes and gene clusters of *Aspergillus nidulans*, *A. fumigatus*, *A. niger* and *A. oryzae*. BMC microbiology 13, 91.

- Ishidoh, K., Kinoshita, H. & Nihira, T. (2014).** Identification of a gene cluster responsible for the biosynthesis of cyclic lipopeptide verlamelin. *Applied microbiology and biotechnology* 98, 7501-7510.
- Itoh, T., Tokunaga, K., Matsuda, Y., Fujii, I., Abe, I., Ebizuka, Y. & Kushiro, T. (2010).** Reconstitution of a fungal meroterpenoid biosynthesis reveals the involvement of a novel family of terpene cyclases. *Nature chemistry* 2, 858-864.
- Jacob, F., Perrin, D., Sanchez, C. & Monod, J. (1960).** [Operon: a group of genes with the expression coordinated by an operator]. *Comptes rendus hebdomadaires des seances de l'Academie des sciences* 250, 1727-1729.
- Jain, R., Valiante, V., Remme, N., Docimo, T., Heinekamp, T., Hertweck, C., Gershenzon, J., Haas, H. & Brakhage, A. A. (2011).** The MAP kinase MpkA controls cell wall integrity, oxidative stress response, gliotoxin production and iron adaptation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology* 82, 39-53.
- Kaysser, L., Bernhardt, P., Nam, S. J., Loesgen, S., Ruby, J. G., Skewes-Cox, P., Jensen, P. R., Fenical, W. & Moore, B. S. (2012).** Merochlorins A-D, cyclic meroterpenoid antibiotics biosynthesized in divergent pathways with vanadium-dependent chloroperoxidases. *Journal of the American Chemical Society* 134, 11988-11991.
- Keeling, P. J. (2009).** Functional and ecological impacts of horizontal gene transfer in eukaryotes. *Current opinion in genetics & development* 19, 613-619.
- Khaldi, N., Collemare, J., Lebrun, M. H. & Wolfe, K. H. (2008).** Evidence for horizontal transfer of a secondary metabolite gene cluster between fungi. *Genome biology* 9, R18.
- Kim, S. H., Kang, H. J., Na, H. & Lee, M. O. (2010).** Trichostatin A enhances acetylation as well as protein stability of ERalpha through induction of p300 protein. *Breast cancer research : BCR* 12, R22.
- Kim, S. S., Kim, Y. H. & Shin, K. S. (2013).** The developmental regulators, FlbB and FlbE, are involved in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of microbiology and biotechnology* 23, 766-770.
- Koch, K. A., Allard, S., Santoro, N., Cote, J. & Thiele, D. J. (2001).** The *Candida glabrata* Amt1 copper-sensing transcription factor requires Swi/Snf and Gcn5 at a critical step in copper detoxification. *Molecular microbiology* 40, 1165-1174.
- König, C. (2009).** Aktivierung eines stillen Genclusters des humanpathogenen Pilzes *Aspergillus fumigatus* durch Kultivierung mit *Streptomyces rapamycinicus*, pp. 90: Friedrich-Schiller-Universität.
- König, C. C., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F., Nietzsche, S., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2013).** Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 14, 938-942.

Korman, T. P., Crawford, J. M., Labonte, J. W., Newman, A. G., Wong, J., Townsend, C. A. & Tsai, S. C. (2010). Structure and function of an iterative polyketide synthase thioesterase domain catalyzing Claisen cyclization in aflatoxin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107, 6246-6251.

Korolyev, E., Steinberg-Neifach, O. & Eshel, D. (2005). Mutations in the yeast kinesin-like Cin8p are alleviated by osmotic support. *FEMS microbiology letters* 244, 379-383.

Kraus, P. R., Fox, D. S., Cox, G. M. & Heitman, J. (2003). The *Cryptococcus neoformans* MAP kinase Mpk1 regulates cell integrity in response to antifungal drugs and loss of calcineurin function. *Molecular microbiology* 48, 1377-1387.

Kremer, A., Westrich, L. & Li, S. M. (2007). A 7-dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*: overproduction, purification and biochemical characterization. *Microbiology* 153, 3409-3416.

Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. (2000). Pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*: cloning, characterization and application as a dominant selectable marker for transformation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64, 1416-1421.

Kubodera, T., Yamashita, N. & Nishimura, A. (2002). Transformation of *Aspergillus sp.* and *Trichoderma reesei* using the pyrithiamine resistance gene (*ptrA*) of *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 66, 404-406.

Kumar, Y. & Goodfellow, M. (2008). Five new members of the *Streptomyces violaceusniger* 16S rRNA gene clade: *Streptomyces castelarensis* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces himastatinicus* sp. nov., *Streptomyces mordarskii* sp. nov., *Streptomyces rapamycinicus* sp. nov. and *Streptomyces ruanii* sp. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 58, 1369-1378.

Kupfahl, C., Heinekamp, T., Geginat, G., Ruppert, T., Hartl, A., Hof, H. & Brakhage, A. A. (2006). Deletion of the *gliP* gene of *Aspergillus fumigatus* results in loss of gliotoxin production but has no effect on virulence of the fungus in a low-dose mouse infection model. *Molecular microbiology* 62, 292-302.

Kwon, N. J., Shin, K. S. & Yu, J. H. (2010). Characterization of the developmental regulator FlbE in *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 47, 981-993.

Langfelder, K., Jahn, B., Gehringer, H., Schmidt, A., Wanner, G. & Brakhage, A. A. (1998). Identification of a polyketide synthase gene (*pksP*) of *Aspergillus fumigatus* involved in conidial pigment biosynthesis and virulence. *Medical microbiology and immunology* 187, 79-89.

Latgé, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews* 12, 310-350.

Latgé, J. P. (2001). The pathobiology of *Aspergillus fumigatus*. Trends in microbiology 9, 382-389.

Latgé, J. P. (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. Molecular microbiology 66, 279-290.

Li, Y., Chooi, Y. H., Sheng, Y., Valentine, J. S. & Tang, Y. (2011). Comparative characterization of fungal anthracenone and naphthacenedione biosynthetic pathways reveals an alpha-hydroxylation-dependent Claisen-like cyclization catalyzed by a dimanganese thioesterase. Journal of the American Chemical Society 133, 15773-15785.

Licciardi, P. V., Ververis, K., Tang, M. L., El-Osta, A. & Karagiannis, T. C. (2013). Immunomodulatory effects of histone deacetylase inhibitors. Current molecular medicine 13, 640-647.

Liebmann, B., Müller, M., Braun, A. & Brakhage, A. A. (2004). The cyclic AMP-dependent protein kinase a network regulates development and virulence in *Aspergillus fumigatus*. Infection and immunity 72, 5193-5203.

Lim, F. Y., Hou, Y., Chen, Y., Oh, J. H., Lee, I., Bugni, T. S. & Keller, N. P. (2012). Genome-based cluster deletion reveals an endocrocin biosynthetic pathway in *Aspergillus fumigatus*. Applied and environmental microbiology 78, 4117-4125.

Lo, H. C., Entwistle, R., Guo, C. J., Ahuja, M., Szewczyk, E., Hung, J. H., Chiang, Y. M., Oakley, B. R. & Wang, C. C. (2012). Two separate gene clusters encode the biosynthetic pathway for the meroterpenoids austinol and dehydroaustinol in *Aspergillus nidulans*. Journal of the American Chemical Society 134, 4709-4720.

Luk, L. Y. & Tanner, M. E. (2009). Mechanism of dimethylallyltryptophan synthase: evidence for a dimethylallyl cation intermediate in an aromatic prenyltransferase reaction. Journal of the American Chemical Society 131, 13932-13933.

Machida, M., Yamada, O. & Gomi, K. (2008). Genomics of *Aspergillus oryzae*: learning from the history of Koji mold and exploration of its future. DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 15, 173-183.

Maier, A., Riedlinger, J., Fiedler, H. P. & Hampp, R. (2004). *Actinomycetales* bacteria from a spruce stand: Characterization and effects on growth of root symbiotic and plant parasitic soil fungie in dual culture. Mycological Progress 3, 129-136.

Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2005). A death round affecting a young compartmentalized mycelium precedes aerial mycelium dismantling in confluent surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. Microbiology 151, 3689-3697.

- Manteca, A., Fernandez, M. & Sanchez, J. (2006).** Cytological and biochemical evidence for an early cell dismantling event in surface cultures of *Streptomyces antibioticus*. Research in microbiology 157, 143-152.
- Manteca, A., Claessen, D., Lopez-Iglesias, C. & Sanchez, J. (2007).** Aerial hyphae in surface cultures of *Streptomyces lividans* and *Streptomyces coelicolor* originate from viable segments surviving an early programmed cell death event. FEMS microbiology letters 274, 118-125.
- Manteca, A., Alvarez, R., Salazar, N., Yague, P. & Sanchez, J. (2008).** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged cultures of *Streptomyces coelicolor*. Applied and environmental microbiology 74, 3877-3886.
- Marcet-Houben, M. & Gabaldon, T. (2010).** Acquisition of prokaryotic genes by fungal genomes. Trends in genetics : TIG 26, 5-8.
- Marmorstein, R. (2001).** Structure of histone acetyltransferases. Journal of molecular biology 311, 433-444.
- Maschmeyer, G., Haas, A. & Cornely, O. A. (2007).** Invasive aspergillosis: epidemiology, diagnosis and management in immunocompromised patients. Drugs 67, 1567-1601.
- Maubon, D., Park, S., Tanguy, M., Huerre, M., Schmitt, C., Prevost, M. C., Perlin, D. S., Latgé, J. P. & Beauvais, A. (2006).** AGS3, an alpha(1-3)glucan synthase gene family member of *Aspergillus fumigatus*, modulates mycelium growth in the lung of experimentally infected mice. Fungal genetics and biology : FG & B 43, 366-375.
- May, G. S., Xue, T., Kontoyiannis, D. P. & Gustin, M. C. (2005).** Mitogen activated protein kinases of *Aspergillus fumigatus*. Medical mycology 43 Suppl 1, S83-86.
- McDonagh, A., Fedorova, N. D., Crabtree, J., Yu, Y., Kim, S. & other authors (2008).** Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS pathogens 4, e1000154.
- McLaughlin, D. J., Hibbett, D. S., Lutzoni, F., Spatafora, J. W. & Vilgalys, R. (2009).** The search for the fungal tree of life. Trends in microbiology 17, 488-497.
- Mellado, E., Aufauvre-Brown, A., Gow, N. A. & Holden, D. W. (1996).** The *Aspergillus fumigatus* *chsC* and *chsG* genes encode class III chitin synthases with different functions. Molecular microbiology 20, 667-679.
- Mellado, E., Dubreucq, G., Mol, P., Sarfati, J., Paris, S., Diaquin, M., Holden, D. W., Rodriguez-Tudela, J. L. & Latgé, J. P. (2003).** Cell wall biogenesis in a double chitin synthase mutant (*chsG*-/*chsE*-) of *Aspergillus fumigatus*. Fungal genetics and biology : FG & B 38, 98-109.
- Mendez, C., Brana, A. F., Manzanal, M. B. & Hardisson, C. (1985).** Role of substrate mycelium in colony development in *Streptomyces*. Canadian journal of microbiology 31, 446-450.

- Merkel, A. B., Major, L. L., Errey, J. C., Burkart, M. D., Field, R. A., Walsh, C. T. & Naismith, J. H. (2004).** The position of a key tyrosine in dTDP-4-Keto-6-deoxy-D-glucose-5-epimerase (EvaD) alters the substrate profile for this RmlC-like enzyme. *The Journal of biological chemistry* 279, 32684-32691.
- Miao, F. P., Li, X. D., Liu, X. H., Cichewicz, R. H. & Ji, N. Y. (2012).** Secondary metabolites from an algicolous *Aspergillus versicolor* strain. *Marine drugs* 10, 131-139.
- Migueluez, E. M., Hardisson, C. & Manzanal, M. B. (1999).** Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *The Journal of cell biology* 145, 515-525.
- Miller, J. H. (1972).** *Experiments in molecular genetics.*: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Mouyna, I., Fontaine, T., Vai, M., Monod, M., Fonzi, W. A., Diaquin, M., Popolo, L., Hartland, R. P. & Latgé, J. P. (2000).** Glycosylphosphatidylinositol-anchored glucanotransferases play an active role in the biosynthesis of the fungal cell wall. *The Journal of biological chemistry* 275, 14882-14889.
- Mouyna, I., Henry, C., Doering, T. L. & Latgé, J. P. (2004).** Gene silencing with RNA interference in the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *FEMS microbiology letters* 237, 317-324.
- Mullins, J., Harvey, R. & Seaton, A. (1976).** Sources and incidence of airborne *Aspergillus fumigatus* (Fres). *Clinical allergy* 6, 209-217.
- Mullins, J., Hutcheson, P. S. & Slavin, R. G. (1984).** *Aspergillus fumigatus* spore concentration in outside air: Cardiff and St Louis compared. *Clinical allergy* 14, 351-354.
- Muramatsu, H., Mihara, H., Goto, M., Miyahara, I., Hirotsu, K., Kurihara, T. & Esaki, N. (2005).** A new family of NAD(P)H-dependent oxidoreductases distinct from conventional Rossmann-fold proteins. *Journal of bioscience and bioengineering* 99, 541-547.
- Negrete-Urtasun, S., Reiter, W., Diez, E., Denison, S. H., Tilburn, J., Espeso, E. A., Penalva, M. A. & Arst, H. N. J. (1999).** Ambient pH signal transduction in *Aspergillus*: completion of gene characterization. *Molecular microbiology* 33, 994-1003.
- Nett, M., Ikeda, H. & Moore, B. S. (2009).** Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the *Actinomycetes*. *Natural product reports* 26, 1362-1384.
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S. & other authors (2005).** Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature* 438, 1151-1156.
- Nützmann, H. W., Reyes-Dominguez, Y., Scherlach, K., Schroeckh, V., Horn, F. & other authors (2011).** Bacteria-induced natural product formation in the fungus *Aspergillus nidulans*

requires Saga/Ada-mediated histone acetylation. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 108, 14282-14287.

Nützmann, H. W., Schroeckh, V. & Brakhage, A. A. (2012). Regulatory cross talk and microbial induction of fungal secondary metabolite gene clusters. Methods in enzymology 517, 325-341.

O'Gorman, C. M., Fuller, H. & Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Nature 457, 471-474.

Oh, D. C., Jensen, P. R., Kauffman, C. A. & Fenical, W. (2005). Libertellenones A-D: induction of cytotoxic diterpenoid biosynthesis by marine microbial competition. Bioorganic & medicinal chemistry 13, 5267-5273.

Oh, D. C., Kauffman, C. A., Jensen, P. R. & Fenical, W. (2007). Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella sp.* in competing co-culture. Journal of natural products 70, 515-520.

Owens, R. A., Hammel, S., Sheridan, K. J., Jones, G. W. & Doyle, S. (2014). A proteomic approach to investigating gene cluster expression and secondary metabolite functionality in *Aspergillus fumigatus*. PloS one 9, e106942.

Palmer, J. M., Mallareddy, S., Perry, D. W., Sanchez, J. F., Theisen, J. M. & other authors (2010). Telomere position effect is regulated by heterochromatin-associated proteins and NkuA in *Aspergillus nidulans*. Microbiology 156, 3522-3531.

Park, H. B., Kwon, H. C., Lee, C. H. & Yang, H. O. (2009). Glionitrin A, an antibiotic-antitumor metabolite derived from competitive interaction between abandoned mine microbes. Journal of natural products 72, 248-252.

Patron, N. J., Waller, R. F., Cozijnsen, A. J., Straney, D. C., Gardiner, D. M., Nierman, W. C. & Howlett, B. J. (2007). Origin and distribution of epipolythiodioxopiperazine (ETP) gene clusters in filamentous ascomycetes. BMC evolutionary biology 7, 174.

Perlin, J. (2014). Toward a healthier tomorrow. Interview by Matthew Weinstock. Trustee : the journal for hospital governing boards 67, 21-23, 21.

Perrin, R. M., Fedorova, N. D., Bok, J. W., Cramer, R. A., Wortman, J. R., Kim, H. S., Nierman, W. C. & Keller, N. P. (2007). Transcriptional regulation of chemical diversity in *Aspergillus fumigatus* by LaeA. PLoS pathogens 3, e50.

Peserico, A. & Simone, C. (2011). Physical and functional HAT/HDAC interplay regulates protein acetylation balance. Journal of biomedicine & biotechnology 2011, 371832.

Peterson, S. W. (2008). Phylogenetic analysis of *Aspergillus* species using DNA sequences from four loci. Mycologia 100, 205-226.

- Pitt, J. I. (1994).** The current role of *Aspergillus* and *Penicillium* in human and animal health. Journal of medical and veterinary mycology : bi-monthly publication of the International Society for Human and Animal Mycology 32 Suppl 1, 17-32.
- Pojer, F., Wemakor, E., Kammerer, B., Chen, H., Walsh, C. T., Li, S. M. & Heide, L. (2003).** CloQ, a prenyltransferase involved in clorobiocin biosynthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100, 2316-2321.
- Pontecorvo, G., Roper, J. A., Hemmons, L. M., Macdonald, K. D. & Bufton, A. W. (1953).** The genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in genetics 5, 141-238.
- Prapagdee, B., Kuekulvong, C. & Mongkolsuk, S. (2008).** Antifungal potential of extracellular metabolites produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. International journal of biological sciences 4, 330-337.
- Prauser, H. & Falta, R. (1968).** [Phage sensitivity, cell wall composition and taxonomy of *Actinomyces*]. Zeitschrift fur allgemeine Mikrobiologie 8, 39-46.
- Rappleye, C. A., Engle, J. T. & Goldman, W. E. (2004).** RNA interference in *Histoplasma capsulatum* demonstrates a role for alpha-(1,3)-glucan in virulence. Molecular microbiology 53, 153-165.
- Rappleye, C. A., Eissenberg, L. G. & Goldman, W. E. (2007).** *Histoplasma capsulatum* alpha-(1,3)-glucan blocks innate immune recognition by the beta-glucan receptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104, 1366-1370.
- Rateb, M. E., Hallyburton, I., Housson, W. E., Bull, A. T., Goodfellow, M., Santhanam, R., Jaspers, M. & Ebel, R. (2013).** Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. RSC Advances, 14444-14450.
- Raymond, B., Batsche, E., Boutillon, F., Wu, Y. Z., Leduc, D. & other authors (2009).** Anthrax lethal toxin impairs IL-8 expression in epithelial cells through inhibition of histone H3 modification. PLoS pathogens 5, e1000359.
- Reyes-Dominguez, Y., Narendja, F., Berger, H., Gallmetzer, A., Fernandez-Martin, R., Garcia, I., Scazzocchio, C. & Strauss, J. (2008).** Nucleosome positioning and histone H3 acetylation are independent processes in the *Aspergillus nidulans* *prnD-prnB* bidirectional promoter. Eukaryotic cell 7, 656-663.
- Riedlinger, J., Schrey, S. D., Tarkka, M. T., Hampp, R., Kapur, M. & Fiedler, H. P. (2006).** Auxofuran, a novel metabolite that stimulates the growth of fly agaric, is produced by the mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* strain AcH 505. Applied and environmental microbiology 72, 3550-3557.
- Rohlf, M., Albert, M., Keller, N. P. & Kempken, F. (2007).** Secondary chemicals protect mould from fungivory. Biology letters 3, 523-525.

- Rohlfs, M. & Churchill, A. C. (2011).** Fungal secondary metabolites as modulators of interactions with insects and other arthropods. *Fungal genetics and biology* : FG & B 48, 23-34.
- Ronning, C. M., Fedorova, N. D., Bowyer, P., Coulson, R., Goldman, G. & other authors (2005).** Genomics of *Aspergillus fumigatus*. *Revista iberoamericana de micologia* 22, 223-228.
- Rossmann, M. G., Moras, D. & Olsen, K. W. (1974).** Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-199.
- Roth, S. Y., Denu, J. M. & Allis, C. D. (2001).** Histone acetyltransferases. *Annual review of biochemistry* 70, 81-120.
- Sakai, K., Kinoshita, H. & Nihira, T. (2012).** Heterologous expression system in *Aspergillus oryzae* for fungal biosynthetic gene clusters of secondary metabolites. *Applied microbiology and biotechnology* 93, 2011-2022.
- Samson, R. A. & Van Reenen-Hoekstra, E. S. (1988).** *Introduction to food-borne fungi*: Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn.
- Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. & Varga, J. (2007).** Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section Fumigati and its teleomorph *Neosartorya*. *Studies in mycology* 59, 147-203.
- Sato, M., Nakazawa, T., Tsunematsu, Y., Hotta, K. & Watanabe, K. (2013).** Echinomycin biosynthesis. *Current opinion in chemical biology* 17, 537-545.
- Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. A. & Hertweck, C. (2012).** Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Applied microbiology and biotechnology* 93, 467-472.
- Scherlach, K., Graupner, K. & Hertweck, C. (2013).** Molecular bacteria-fungi interactions: effects on environment, food, and medicine. *Annual review of microbiology* 67, 375-397.
- Schmaler-Ripcke, J., Sugareva, V., Gebhardt, P., Winkler, R., Kniemeyer, O., Heinekamp, T. & Brakhage, A. A. (2009).** Production of pyomelanin, a second type of melanin, via the tyrosine degradation pathway in *Aspergillus fumigatus*. *Applied and environmental microbiology* 75, 493-503.
- Schrettl, M., Kim, H. S., Eisendle, M., Kragl, C., Nierman, W. C. & other authors (2008).** SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular microbiology* 70, 27-43.
- Schrettl, M., Beckmann, N., Varga, J., Heinekamp, T., Jacobsen, I. D. & other authors (2010).** HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS pathogens* 6, e1001124.

- Schrey, S. D., Schellhammer, M., Ecke, M., Hampp, R. & Tarkka, M. T. (2005).** Mycorrhiza helper bacterium *Streptomyces* Ach 505 induces differential gene expression in the ectomycorrhizal fungus *Amanita muscaria*. *The New phytologist* 168, 205-216.
- Schroeckh, V., Scherlach, K., Nützmann, H. W., Shelest, E., Schmidt-Heck, W., Schuemann, J., Martin, K., Hertweck, C. & Brakhage, A. A. (2009).** Intimate bacterial-fungal interaction triggers biosynthesis of archetypal polyketides in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106, 14558-14563.
- Scott, J. J., Oh, D. C., Yuceer, M. C., Klepzig, K. D., Clardy, J. & Currie, C. R. (2008).** Bacterial protection of beetle-fungus mutualism. *Science* 322, 63.
- Sehgal, S. N., Baker, H. & Vezina, C. (1975).** Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* 28, 727-732.
- Shirling, E. B. & Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *International Journal Systematic Bacteriology*, 313-340.
- Shwab, E. K., Bok, J. W., Tribus, M., Galehr, J., Graessle, S. & Keller, N. P. (2007).** Histone deacetylase activity regulates chemical diversity in *Aspergillus*. *Eukaryotic cell* 6, 1656-1664.
- Sinclair, S. H., Rennoll-Bankert, K. E. & Dumler, J. S. (2014).** Effector bottleneck: microbial reprogramming of parasitized host cell transcription by epigenetic remodeling of chromatin structure. *Frontiers in genetics* 5, 274.
- Smith, D. J., Burnham, M. K., Bull, J. H., Hodgson, J. E., Ward, J. M. & other authors (1990).** Beta-lactam antibiotic biosynthetic genes have been conserved in clusters in prokaryotes and eukaryotes. *The EMBO journal* 9, 741-747.
- Soliman, S. S. & Raizada, M. N. (2013).** Interactions between Co-Habiting fungi Elicit Synthesis of Taxol from an Endophytic Fungus in Host Taxus Plants. *Frontiers in microbiology* 4, 3.
- Soukup, A. A., Chiang, Y. M., Bok, J. W., Reyes-Dominguez, Y., Oakley, B. R., Wang, C. C., Strauss, J. & Keller, N. P. (2012).** Overexpression of the *Aspergillus nidulans* histone 4 acetyltransferase EsaA increases activation of secondary metabolite production. *Molecular microbiology* 86, 314-330.
- Stammers, D. K., Ren, J., Leslie, K., Nichols, C. E., Lamb, H. K., Cocklin, S., Dodds, A. & Hawkins, A. R. (2001).** The structure of the negative transcriptional regulator NmrA reveals a structural superfamily which includes the short-chain dehydrogenase/reductases. *The EMBO journal* 20, 6619-6626.
- Steffan, N., Grundmann, A., Yin, W. B., Kremer, A. & Li, S. M. (2009).** Indole prenyltransferases from fungi: a new enzyme group with high potential for the production of prenylated indole derivatives. *Current medicinal chemistry* 16, 218-231.

- Steffan, N. & Li, S. M. (2009).** Increasing structure diversity of prenylated diketopiperazine derivatives by using a 4-dimethylallyltryptophan synthase. *Archives of microbiology* 191, 461-466.
- Steglich, W. & Reininger, W. (1970).** A synthesis of endocrocin, endocrocin-9-anthrone, and related compounds. *Journal of the Chemical Society D: Chemical Communications*.
- Sterner, D. E. & Berger, S. L. (2000).** Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and molecular biology reviews* : MMBR 64, 435-459.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S. & Price, B. D. (2006).** Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS letters* 580, 4353-4356.
- Sung, B., Pandey, M. K., Ahn, K. S., Yi, T., Chaturvedi, M. M., Liu, M. & Aggarwal, B. B. (2008).** Anacardic acid (6-nonadecyl salicylic acid), an inhibitor of histone acetyltransferase, suppresses expression of nuclear factor-kappaB-regulated gene products involved in cell survival, proliferation, invasion, and inflammation through inhibition of the inhibitory subunit of nuclear factor-kappaBalpha kinase, leading to potentiation of apoptosis. *Blood* 111, 4880-4891.
- Syntichaki, P. & Thireos, G. (1998).** The Gcn5.Ada complex potentiates the histone acetyltransferase activity of Gcn5. *The Journal of biological chemistry* 273, 24414-24419.
- Szewczyk, E., Nayak, T., Oakley, C. E., Edgerton, H., Xiong, Y., Taheri-Talesh, N., Osmani, S. A. & Oakley, B. R. (2006).** Fusion PCR and gene targeting in *Aspergillus nidulans*. *Nature protocols* 1, 3111-3120.
- Szewczyk, E., Chiang, Y. M., Oakley, C. E., Davidson, A. D., Wang, C. C. & Oakley, B. R. (2008).** Identification and characterization of the asperthecin gene cluster of *Aspergillus nidulans*. *Applied and environmental microbiology* 74, 7607-7612.
- Takehara, T., Inoue, M., Morioka, T. & Yokogawa, K. (1981).** Purification and properties of endo-alpha-1,3-glucanase from a *Streptomyces chartreusis* strain. *Journal of bacteriology* 145, 729-735.
- Tao, L. & Yu, J. H. (2011).** AbaA and WetA govern distinct stages of *Aspergillus fumigatus* development. *Microbiology* 157, 313-326.
- Tarkka, M. T., Sarniguet, A. & Frey-Klett, P. (2009).** Inter-kingdom encounters: recent advances in molecular bacterium-fungus interactions. *Current genetics* 55, 233-243.
- Tekaia, F. & Latgé, J. P. (2005).** *Aspergillus fumigatus*: saprophyte or pathogen? *Current opinion in microbiology* 8, 385-392.

- Teng, Y., Yu, Y. & Waters, R. (2002).** The *Saccharomyces cerevisiae* histone acetyltransferase Gcn5 has a role in the photoreactivation and nucleotide excision repair of UV-induced cyclobutane pyrimidine dimers in the MFA2 gene. *Journal of molecular biology* 316, 489-499.
- Tsai, H. F., Wheeler, M. H., Chang, Y. C. & Kwon-Chung, K. J. (1999).** A developmentally regulated gene cluster involved in conidial pigment biosynthesis in *Aspergillus fumigatus*. *Journal of bacteriology* 181, 6469-6477.
- Tseng, T. T., Tyler, B. M. & Setubal, J. C. (2009).** Protein secretion systems in bacterial-host associations, and their description in the Gene Ontology. *BMC microbiology* 9 Suppl 1, S2.
- Tsuji, N., Kobayashi, M., Nagashima, K., Wakisaka, Y. & Koizumi, K. (1976).** A new antifungal antibiotic, trichostatin. *The Journal of antibiotics* 29, 1-6.
- Tüncher, A., Reinke, H., Martic, G., Caruso, M. L. & Brakhage, A. A. (2004).** A basic-region helix-loop-helix protein-encoding gene (*devR*) involved in the development of *Aspergillus nidulans*. *Molecular microbiology* 52, 227-241.
- Twumasi-Boateng, K., Yu, Y., Chen, D., Gravelat, F. N., Nierman, W. C. & Sheppard, D. C. (2009).** Transcriptional profiling identifies a role for BrlA in the response to nitrogen depletion and for StuA in the regulation of secondary metabolite clusters in *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic cell* 8, 104-115.
- Unkles, S. E., Valiante, V., Mattern, D. J. & Brakhage, A. A. (2014).** Synthetic biology tools for bioprospecting of natural products in eukaryotes. *Chemistry & biology* 21, 502-508.
- Unsöld, I. A. & Li, S. M. (2005).** Overproduction, purification and characterization of FgaPT2, a dimethylallyltryptophan synthase from *Aspergillus fumigatus*. *Microbiology* 151, 1499-1505.
- Valiante, V., Heinekamp, T., Jain, R., Hartl, A. & Brakhage, A. A. (2008).** The mitogen-activated protein kinase MpkA of *Aspergillus fumigatus* regulates cell wall signaling and oxidative stress response. *Fungal genetics and biology : FG & B* 45, 618-627.
- Valiante, V., Jain, R., Heinekamp, T. & Brakhage, A. A. (2009).** The MpkA MAP kinase module regulates cell wall integrity signaling and pyomelanin formation in *Aspergillus fumigatus*. *Fungal genetics and biology : FG & B* 46, 909-918.
- Vervoort, H. C., Draskovic, M. & Crews, P. (2011).** Histone deacetylase inhibitors as a tool to up-regulate new fungal biosynthetic products: isolation of EGM-556, a cyclodepsipeptide, from *Microascus* sp. *Organic letters* 13, 410-413.
- Vezina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S. N. (1975).** Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *The Journal of antibiotics* 28, 721-726.
- Vorhölter, F. J., Wiggerich, H. G., Scheidle, H., Sidhu, V. K., Mrozek, K., Kuster, H., Puhler, A. & Niehaus, K. (2012).** Involvement of bacterial TonB-dependent signaling in the generation of

an oligogalacturonide damage-associated molecular pattern from plant cell walls exposed to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* pectate lyases. BMC microbiology 12, 239.

Walsh, C. T. (2008). The chemical versatility of natural-product assembly lines. Accounts of chemical research 41, 4-10.

Walton, J. D. (2000). Horizontal gene transfer and the evolution of secondary metabolite gene clusters in fungi: an hypothesis. Fungal genetics and biology : FG & B 30, 167-171.

Wang, W., Ji, J., Li, X., Wang, J., Li, S., Pan, G., Fan, K. & Yang, K. (2014). Angucyclines as signals modulate the behaviors of *Streptomyces coelicolor*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 111, 5688-5693.

Wang, X., Sena Filho, J. G., Hoover, A. R., King, J. B., Ellis, T. K., Powell, D. R. & Cichewicz, R. H. (2010). Chemical epigenetics alters the secondary metabolite composition of guttate excreted by an atlantic-forest-soil-derived *Penicillium citreonigrum*. Journal of natural products 73, 942-948.

Wang, Y. & Dohlman, H. G. (2004). Pheromone signaling mechanisms in yeast: a prototypical sex machine. Science 306, 1508-1509.

Wang, Y. C., Yang, X., Xing, L. H. & Kong, W. Z. (2013). Effects of SAHA on proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells and hepatitis B virus replication. World journal of gastroenterology : WJG 19, 5159-5164.

Waterborg, J. H. (2011). Plant histone acetylation: in the beginning. Biochimica et biophysica acta 1809, 353-359.

West, A. H. & Stock, A. M. (2001). Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. Trends in biochemical sciences 26, 369-376.

Wiemann, P., Guo, C. J., Palmer, J. M., Sekonyela, R., Wang, C. C. & Keller, N. P. (2013). Prototype of an intertwined secondary-metabolite supercluster. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 110, 17065-17070.

Wiemann, P. & Keller, N. P. (2014). Strategies for mining fungal natural products. Journal of industrial microbiology & biotechnology 41, 301-313.

Wildermuth, H. (1970). Development and organization of the aerial mycelium in *Streptomyces coelicolor*. Journal of general microbiology 60, 43-50.

Williams, R. B., Henrikson, J. C., Hoover, A. R., Lee, A. E. & Cichewicz, R. H. (2008). Epigenetic remodeling of the fungal secondary metabolome. Organic & biomolecular chemistry 6, 1895-1897.

- Wu, X., Flatt, P. M., Xu, H. & Mahmud, T. (2009).** Biosynthetic gene cluster of cetoniacytone A, an unusual aminocyclitol from the endosymbiotic Bacterium *Actinomyces* sp. Lu 9419. *Chembiochem : a European journal of chemical biology* 10, 304-314.
- Yagüe, P., Lopez-Garcia, M. T., Rioseras, B., Sanchez, J. & Manteca, A. (2013a).** Pre-sporulation stages of *Streptomyces* differentiation: state-of-the-art and future perspectives. *FEMS microbiology letters* 342, 79-88.
- Yagüe, P., Rodriguez-Garcia, A., Lopez-Garcia, M. T., Martin, J. F., Rioseras, B., Sanchez, J. & Manteca, A. (2013b).** Transcriptomic analysis of *Streptomyces coelicolor* differentiation in solid sporulating cultures: first compartmentalized and second multinucleated mycelia have different and distinctive transcriptomes. *PloS one* 8, e60665.
- Yin, W. B., Chooi, Y. H., Smith, A. R., Cacho, R. A., Hu, Y., White, T. C. & Tang, Y. (2013).** Discovery of cryptic polyketide metabolites from dermatophytes using heterologous expression in *Aspergillus nidulans*. *ACS synthetic biology* 2, 629-634.
- You, D., Yao, L. L., Huang, D., Escalante-Semerena, J. C. & Ye, B. C. (2014).** Acetyl coenzyme A synthetase is acetylated on multiple lysine residues by a protein acetyltransferase with a single Gcn5-type N-acetyltransferase (GNAT) domain in *Saccharopolyspora erythraea*. *Journal of bacteriology* 196, 3169-3178.
- Yu, J. H., Mah, J. H. & Seo, J. A. (2006).** Growth and developmental control in the model and pathogenic aspergilli. *Eukaryotic cell* 5, 1577-1584.
- Yu, S., Khor, T. O., Cheung, K. L., Li, W., Wu, T. Y., Huang, Y., Foster, B. A., Kan, Y. W. & Kong, A. N. (2010).** Nrf2 expression is regulated by epigenetic mechanisms in prostate cancer of TRAMP mice. *PloS one* 5, e8579.
- Zhao, L., Schaefer, D., Xu, H., Modi, S. J., LaCourse, W. R. & Marten, M. R. (2005).** Elastic properties of the cell wall of *Aspergillus nidulans* studied with atomic force microscopy. *Biotechnology progress* 21, 292-299.
- Zore, G. B., Thakre, A. D., Jadhav, S. & Karuppayil, S. M. (2011).** Terpenoids inhibit *Candida albicans* growth by affecting membrane integrity and arrest of cell cycle. *Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology* 18, 1181-1190.
- Zuck, K. M., Shipley, S. & Newman, D. J. (2011).** Induced production of N-formyl alkaloids from *Aspergillus fumigatus* by co-culture with *Streptomyces peucetius*. *Journal of natural products* 74, 1653-1657.
- Zutz, C., Gacek, A., Sulyok, M., Wagner, M., Strauss, J. & Rychli, K. (2013).** Small chemical chromatin effectors alter secondary metabolite production in *Aspergillus clavatus*. *Toxins* 5, 1723-1741.

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>A. fumigatus</i> auf Festmedium, sowie mikroskopische Aufnahmen der Konidiophore	3
Abbildung 2: Aufbau der Zellwand von <i>A. fumigatus</i>	6
Abbildung 3: Rezeptorvermittelte Signalweiterleitung in <i>A. fumigatus</i>	6
Abbildung 4: <i>S. rapamycinicus</i> auf Platte und spiralförmige Anordnung der Sporen	9
Abbildung 5: Entwicklungsstadien von Streptomyceten	10
Abbildung 6: Färbung einer <i>A. fumigatus</i> -Kultur bzw. Kokultur mit <i>S. rapamycinicus</i> nach 24 h in AMM	35
Abbildung 7: Struktur der Fumicycline A und B	36
Abbildung 8: Organisation der Fumicyclin-Biosynthesegene	37
Abbildung 9: Deletion des Transkriptionsfaktorgens <i>fccR</i>	39
Abbildung 10: Transkriptmenge der <i>fcc</i> -Gene des Fumicyclin-Clusters im $\Delta fccR$ -Stamm.....	40
Abbildung 11: Metabolit-Produktion des <i>fccR</i> -Deletionsstammes	40
Abbildung 12: Übersicht des <i>fccR</i> -Überexpressionsstammes OE <i>fccR</i>	42
Abbildung 13: Kulturen von Wildtyp und OE <i>fccR</i> in AMM bzw. AMM mit Acetat in Kokultur mit <i>S. rapamycinicus</i>	42
Abbildung 14: Analyse der Fumicyclin-Produktion im WT und im OE <i>fccR</i> -Stamm	43
Abbildung 15: Bestimmung der gebildeten <i>fcc</i> -Transkriptmengen im Wildtyp und OE <i>fccR</i> -Stamm unter induzierenden Bedingungen	44
Abbildung 16: Deletion des Thioesterasesgens <i>fccB</i>	46
Abbildung 17: Deletion des Monooxygenasesgens <i>fccC</i>	47
Abbildung 18: Deletion des Dimethylallyltryptophansynthase (DMAT)-Gens <i>fccD</i>	49
Abbildung 19: Deletion des Epimerasesgens <i>fccE</i>	50
Abbildung 20: "Northern blot" Analysen der $\Delta fccB$ -, $\Delta fccC$ -, $\Delta fccD$ - und $\Delta fccE$ -Stämme in der Kokultur mit <i>S. rapamycinicus</i>	51
Abbildung 21: Fumicyclin-Produktion in den Deletionsstämmen $\Delta fccB$, $\Delta fccC$, $\Delta fccD$ und $\Delta fccE$	52
Abbildung 22: Kokultivierung von <i>N. fischeri</i> mit <i>S. rapamycinicus</i>	53
Abbildung 23: HPLC-Profil verschiedener Aspergilli kokultiviert mit <i>S. rapamycinicus</i>	55
Abbildung 24: Einfluss von HAT- und HDAC-Inhibitoren auf die <i>fccA</i> -Transkription.....	57

Abbildung 25: Deletion von <i>gcnE</i>	58
Abbildung 26: Morphologische Analyse der $\Delta gcnE$ -Mutante.....	60
Abbildung 27: Auskeimungsrate von $\Delta gcnE$ in AMM	62
Abbildung 28: Kokultur von <i>gcnE</i> und <i>S. rapamycinicus</i>	62
Abbildung 29: Sekundärmetabolitproduktion von $\Delta gcnE$	63
Abbildung 30: Fumicyclin-Produktion bei definierten Eisenkonzentrationen.....	65
Abbildung 31: Transkriptmenge von <i>fccR</i> und <i>fccA</i> in der Kokultur der Stämme $\Delta hapX$ und $\Delta sreA$ mit <i>S. rapamycinicus</i>	66
Abbildung 32: HPLC-Profil und Schüttelkolben der Kokulturen des Wildtyps (ATCC 46645), des $\Delta hapX$ - und $\Delta sreA$ -Stammes mit <i>S. rapamycinicus</i> unter +Fe- und -Fe-Bedingungen	67
Abbildung 33: Einfluss von <i>S. rapamycinicus</i> auf die Phosphorylierung von MpkA	69
Abbildung 34: Einfluss der Phosphorylierung von MpkA auf die <i>fcc</i> -Transkriptmengen	70
Abbildung 35: Kokulturen der Aminosäureaustauschmutanten von MpkA.....	70
Abbildung 36: Einfluss von SAHA auf die <i>fcc</i> -Transkription im $\Delta mpkA$ -Stamm.....	71
Abbildung 37: Transkription von <i>orsA</i> in $\Delta mpkA$ während der Kokultivierung mit <i>S. rapamycinicus</i>	73
Abbildung 38: Transkriptlevel von <i>fccR</i> und <i>fccA</i> in der <i>ags</i> -Dreifachmutante	74
Abbildung 39: Virulenz des $\Delta fccA$ -Stammes in einem Mausinfektionsmodell	75
Abbildung 40: Verbreitung von <i>fcc</i> -homologen Genen im Pilzreich.....	76
Abbildung 41: FccB katalysiert die Abspaltung des Polyketids von FccA.....	85
Abbildung 42: Prognostizierte Biosynthese der Fumicycline A und B	89
Abbildung 43: Clusteraufbau und Struktur von Fumicyclin und Homologen	101
Abbildung 44: Modell der Fumicyclin-Cluster-Aktivierung in <i>A. fumigatus</i> bei Kokultivierung mit <i>S. rapamycinicus</i>	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Bakterien-Stämme	17
Tabelle 2: Pilz-Stämme	17
Tabelle 3: Anzuchtmedien für <i>E. coli</i> , <i>S. rapamycinicus</i> und <i>Aspergillus spp.</i>	18
Tabelle 4: Zusätze zu <i>E. coli</i> -Medien	20
Tabelle 5: Zusätze zu <i>A. fumigatus</i> -Medien	20
Tabelle 6: Verwendete Lösungen und Puffer	20
Tabelle 7: Verwendete Plasmide	22
Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide	22
Tabelle 9: Auflistung der Gene des Fumicyclin-Clusters	37
Tabelle 10: blastn-Analyse der Genom-Sequenzen	77
Tabelle 11: blastn-Analyse der Transkript-Sequenzen	78
Tabelle 12: blastp-Analyse der Protein-Sequenzen	79

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad-Celsius	GPCR	G-Protein gekoppelter Rezeptor
µl	Mikroliter	h	Stunde
µM	Mikromolar	HAT	Histonacetyltransferase
A	Adenin/ Alanin	HDAC	Histondeacetylasen
<i>A.</i>	<i>Aspergillus/Arthroderma</i>	HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
AMM	<i>Aspergillus</i> Minimal Medium	Hyg	Hygromycin
Amp	Ampicilin	IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
AS	Aminosäure	JMRC	Jena Microbial Resource Collection
ATCC	American Type Culture Collection	kb	Kilobasenpaar
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool	l	Liter
Ble	Bleomycin	LB	Lysogeny Broth
bp	Basenpaar	M	Molar (mol/l)
bZIP	basischer Zipper	MALDI	Matrix-assistierter Laser
C	Cytosin/ Kohlenstoff	-IMS	Desorption/Ionisations-Imaging-Massenspektrometrie
<i>C.</i>	<i>Candida</i>	MAPK	Mitogen-aktiviertes Protein Kinase
DEPC	Diethylpyrocarbonat	Mbp	Megabasenpaare
DHN	Dihydroxynaphthol	mg	Milligramm
DMAT	Dimethylallyltryptophansynthase	min	Minute(n)
DMSO	Dimethylsulfoxid	ml	Milliliter
DNA	Desoxyribonukleinsäure	mM	Millimolar (mmol/l)
dNTP	Desoxynukleotide	MOPS	3-(N-morpholino)propansulfonsäure
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>	mRNA	messenger RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	MS	Massenspektrometrie
<i>et al.</i>	„et alii“ (italienisch, „und andere“)	<i>N.</i>	<i>Neosartorya</i>
F	Phenylalanin	NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
FAD	Flavin Adenin-Dinukleotid	H	
FGSC	Fungal Genetics Stock Center	ng	Nanogramm
G	Guanin	NMR	Kernspinresonanz
g	Gramm		

NRPS	nichtribosomale Peptidsynthetase	S.	<i>Saccharomyces / Streptomyces</i>
OE	Überexpression	SDS	Natriumdodecylsulfat
ori	Replikationsursprung	SSC	Saline-Sodium Citrate
<i>P.</i>	<i>Pseudomonas</i>	T	Threonin/ Thymin
PAGE	Polyacrylamid- Gelelektrophorese	<i>T.</i>	<i>Trichophyton</i>
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung	TF	Transkriptionsfaktor
PCR	Polymerase-Kettenreaktion	Tris	Tris-(hydroxymethyl)- aminomethan
PEG	Polyethylenglykol	<i>TtrpC</i>	Terminator von <i>trpC</i> aus <i>A. nidulans</i>
<i>PgpdA</i>	Promotor der Glyceraldehyd-3- Phosphat-Dehydrogenase aus <i>A. nidulans</i>	Upm	Umdrehungen pro Minute
PKS	Polyketidsynthase	UV	ultraviolett
PT	Pyridithiamin	V	Volt
^R	Resistenz	v/v	Volumen pro Volumen
RNA	Ribonukleinsäure	w/v	Gewicht pro Volumen
rRNA	ribosomale RNA	WT	Wildtyp
		Y	Tyrosin
		Δ	Deletion

Liste der wissenschaftlichen Publikationen und Vorträge

Schriftliche Veröffentlichungen

König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Horn F, Nietzsche S, Brakhage AA, Hertweck C.

Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. Chembiochem. 2013 May 27;14(8):938-42. doi: 10.1002/cbic.201300070

Netzker T, Fischer J, Weber J, Mattern DJ, **König CC**, Valiante V, Schroeckh V, Brakhage AA

Microbial communication triggers the activation of silent fungal secondary metabolite gene clusters; Front. Microbiol. (Eingereicht)

Tagungsbeiträge

König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Nützmann HW, Hertweck C, Brakhage AA (Poster)

Activation of a silent secondary metabolite gene cluster in *Aspergillus fumigatus* by co-cultivation with *Streptomyces rapamycinicus*

VAAM-Jahrestagung, 2011, Karlsruhe

König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Nützmann HW, Hertweck C, Brakhage AA (Poster)

Activation of a silent secondary metabolite gene cluster in *Aspergillus fumigatus* by co-cultivation with *Streptomyces rapamycinicus*

4th Congress of European Microbiologists FEMS, 2011, Genf, Schweiz

König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Nützmann HW, Hertweck C, Brakhage AA (Poster, Vortrag)

Activation of a silent secondary metabolite gene cluster in *Aspergillus fumigatus* by co-cultivation with *Streptomyces rapamycinicus*

11th European Conference on Fungal Genetics (ECFG11) einschließlich Satellitensymposium

9th International *Aspergillus* Meeting (Asperfest), Marburg, 2012

König CC, Scherlach K, Schroeckh V, Hertweck C, Brakhage AA (Poster)

Stimulating encounter: Activation of the silent fumicycline gene cluster in *Aspergillus fumigatus* by *Streptomyces rapamycinicus*

1st European Conference on Natural Products, Frankfurt am Main, 2013

Danksagung

Als erstes möchte ich Professor Brakhage dafür danken, dass er mir die Möglichkeit gegeben hat, in seiner Abteilung zuerst meine Diplomarbeit und anschließend meine Doktorarbeit anzufertigen. Ich danke ihm für das interessante Thema, das mich immer wieder aufs Neue überrascht hat. Ich danke ihm für sein Interesse an meiner Arbeit, sein Verständnis und seine andauernde Unterstützung.

Christina Täumer war für mich immer eine Anlaufstelle bei leichten, schwierigen und persönlichen Fragen. Sie hat das Arbeitsleben leichter und die Zusammenarbeit schöner gemacht. Dafür möchte ich ihr danken.

Besonderer Dank gilt auch ehemaligen und derzeitigen Kollegen und Kolleginnen, wie Hans, Tina, Vito, Jakob und vielen anderen dafür, dass ich mit ihnen die Ergebnisse meiner Arbeit immer auf sehr konstruktive Weise diskutieren konnte und danach immer etwas schlauer war oder neue Ansätze für weitere Experimente hatte.

Dr. Volker Schroeckh danke für sein Wissen und seine Hilfe bei Klonierungsfragen und sein offenes Ohr.

Dr. Kirstin Scherlach möchte ich für ihre Geduld mit mir im Allgemeinen und die nicht mehr zählbaren Analysen meiner Kulturen im Speziellen sowie die Identifizierung der Fumicycline danken.

Maria-Gabriele Schwinger und Carmen Karkowski möchte ich für die Aufreinigungen meiner zahlreichen Kulturen danken.

Christiane Weigel und Grit Walther danke ich für die Bereitstellung zahlreicher Stämme und die Beantwortung vieler Fragen.

Dr. Maria Straßburger und Carmen Schult danke ich für die Durchführung des Mausinfektionsversuches.

Ohne meine Familie, im Besonderen ohne meine Mutter, hätte ich diese Arbeit nicht anfertigen können. Sie hat meine Launen ertragen und mich in schwierigen Phasen wieder aufgebaut. Ich danke ihr, dass sie mir den Rücken freigehalten hat, so dass ich mich auf meine Arbeit konzentrieren konnte.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich habe die vorliegende Dissertation eigenhändig verfasst und dabei weder Textabschnitte aus einer eigenen Prüfungsarbeit oder von dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Die von mir verwendeten Hilfsmittel, persönliche Mitteilungen und Quellen sind in der Arbeit gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung von Material sowie bei der Herstellung des Manuskripts haben mich keine anderen, als die in der Danksagung erwähnten Personen unterstützt. Personen, die an der Anfertigung von Publikationen beteiligt waren, sind in der Publikationsliste angegeben.

Die Hilfe eines Promotionsberaters habe ich nicht in Anspruch genommen. Ebenso wenig haben Dritte von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorliegenden Dissertation stehen.

Ich habe die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Außerdem habe ich weder die gleiche, noch eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 17.05.2015